

(11) Número de Publicação: **PT 870046 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/86 (2007.10) **C07K 14/165** (2007.10)

A61K 39/245 (2007.10) **A61K 39/215** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.11.19**

(30) Prioridade(s): **1995.11.30 FR 9514450**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.10.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.01.07**
071/2009

(73) Titular(es):

MÉRIAL

29, AVENUE TONY GARNIER 69007 LYON FR

(72) Inventor(es):

MICHEL ALBERT EMILE RIVIERE

FR

JEAN-CHRISTOPHE FRANCIS AUDONNET

FR

PHILIPPE GUY NICOLAS BAUDU

FR

(74) Mandatário:

JOÃO PEREIRA DA CRUZ

RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **VACINA VIVA RECOMBINANTE À BASE DE HERPESVÍRUS FELINO DE TIPO 1, ESPECIALMENTE CONTRA A PERITONITE INFECCIOSA FELINA**

(57) Resumo:

RESUMO

**"VACINA VIVA RECOMBINANTE À BASE DE HERPESVÍRUS FELINO DE
TIPO 1, ESPECIALMENTE CONTRA A PERITONITE INFECCIOSA
FELINA"**

É revelada uma vacina recombinante viva, incluindo, como vector, um herpesvírus felino que inclui e expressa, pelo menos, uma sequência de nucleótidos que codifica para um polipéptido, estando a referida sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2. São também revelados uma fórmula de vacina multivalente e fragmentos de DNA do herpesvírus felino

DESCRIÇÃO**"VACINA VIVA RECOMBINANTE À BASE DE HERPESVÍRUS FELINO DE TIPO 1, ESPECIALMENTE CONTRA A PERITONITE INFECCIOSA FELINA"**

A presente invenção refere-se a vacinas, de preferência para gatos, produzidas a partir de herpesvírus felinos recombinantes, e aos métodos de obtenção e de preparação destes vírus recombinantes. Em particular, a presente invenção refere-se mais particularmente aos herpesvírus felinos recombinantes compreendendo uma cassete de vectores para um (ou uns) gene(s) estranho(s).

A rinotraqueíte infecciosa felina é causada pelo herpesvírus felino de tipo 1 (em inglês Feline HerpesVirus Type 1 ou FHV-1). O herpesvírus felino (FHV-1) é classificado na família dos *Alphaherpesvirinae*. A rinotraqueíte infecciosa felina é uma doença muito disseminada nos gatos e, na prática, todos os gatos medicalizados são vacinados contra esta afecção viral. Existem actualmente várias vacinas para prevenir a rinotraqueíte infecciosa. Estas vacinas são de tipo vivo atenuado, ou de tipo inactivado (vírus completo ou subunidades purificadas). A atenuação das vacinas vivas actualmente utilizadas foi obtida após passagens repetidas em células, e a causa da sua atenuação não é conhecida. Além disso, estas vacinas apresentam em

geral uma virulência residual e são por esta razão administradas por via parentérica (subcutânea ou intramuscular) em vez de por via intranasal (que seria no entanto a via escolhida tendo em conta a replicação local deste vírus). As vacinas inactivadas apresentam uma boa inocuidade, mas a sua fraca imunogenicidade necessita de múltiplas injeções para induzir uma protecção satisfatória.

Por exemplo, os gatos domésticos são expostos a várias outras doenças, e o refinamento de um vector vacinal que pudesse expressar diferentes antigénios de agentes patogénicos felinos permitiria simplificar e melhorar a eficácia dos programas de vacinação.

Por fim, de entre as doenças que afectam o gato doméstico, certas resistem sempre às abordagens vacinais clássicas. O caso mais conhecido é o da peritonite infecciosa felina causada por um coronavírus (vírus da Peritonite Infecciosa Felina (PIF) ou, em inglês, "FIPV" (Feline Infectious Peritonitis Virus)).

Um vector FHV-1, em que a atenuação seria tal que este pudesse ser administrado por via oronasal no gato sem desencadear patologia local e/ou geral, e que permitisse a indução de uma resposta imunitária protectora em simultâneo contra a rinotraqueíte infecciosa felina e contra outros agentes patogénicos felinos, constituiria um progresso significativo em matéria de vacinação da população felina doméstica.

Foi já proposto um certo número de genes de FHV como sítios de inserção:

O pedido de patente EP-A-0 447 303 propôs a inserção no sítio RR2 dos alphaherpesvirus, incluindo o FHV.

O pedido dá os meios de efectuar a inserção no sítio RR2 do herpesvírus de peru (vírus HVT).

O pedido de patente WO-A-90 01547 propõe vectores FHV TK para a expressão de genes heterólogos.

Do mesmo modo, o pedido de patente WO-A-93 09238 propõe uma vacina contra a leucemia felina formada por um vector FHV no qual um gene de FeLV foi inserido no gene TK do vírus FHV. Ver também no mesmo sentido os artigos de R.C. WARDLEY *et al.* em *J. Gen. Virol.* 1992. 73. 1811-1818 e de G.E. COLE *et al.* em *J. Virol.* 1990. 64. 4930-4938.

O pedido de patente WO-A-94 03621 propõe a inserção nos genes gI, gE, US9, US10 e US11.

O pedido de patente WO-A-95 00172 propõe inserir um ADN que serve de marcador na região do genoma compreendendo os genes gI e gE.

O pedido de patente EP-A-0 576 092 propõe a grelha de leitura aberta ("ORF") situada entre o gene gC e o gene homólogo do gene HSV-1 UL46 como sítio preferencial para a inserção no genoma FHV. Ver também M.J. WILLEMSE *et al.* em *J. Gen. Virol.* 1994. 75. 3107-3116.

Foram utilizados diversos promotores, incluindo os geralmente disponíveis comercialmente, nas diferentes

construções descritas na técnica anterior, entre os quais o promotor HCMV IE (CMV imediato precoce humano), a sequência promotora da região LTR do vírus RSV (Rous Sarcoma Vírus), e o promotor precoce do vírus SV40.

A presente invenção tem por objectivo proporcionar uma vacina FHV viva, atenuada mas tendo conservado uma boa capacidade de replicação *in vivo*, com vista a imunizar os gatos contra a rinotraqueíte infecciosa.

Um outro objectivo da invenção é proporcionar uma vacina viva recombinante à base de FHV que seja eficaz contra os outros agentes patogénicos felinos. Em particular, devido aos numerosos insucessos observados na vacinação contra a peritonite infecciosa felina com as vacinas inactivadas ou vivas atenuados, principalmente devido ao fenómeno de "facilitação" (exacerbação da doença), a necessidade de uma vacina realmente eficaz contra a PIF existe sempre. Uma tal vacina com base num vector FHV-1 recombinante que seria realmente eficaz contra a peritonite infecciosa felina, doença para a qual ninguém ainda comercializou uma vacina satisfatória, poderia, por outro lado, abrir uma via às vacinas muito eficazes contra outras doenças do gato, como, por exemplo, e entre outras, a leucemia felina, o síndrome da imunodeficiência felina do FIV, ou ainda a panleucopenia felina.

Ainda um outro objectivo da invenção é permitir uma vacinação eficaz dos gatos utilizando a via oronasal.

O requerente caracterizou uma nova parte do genoma de FHV, na qual caracterizou novas regiões do genoma do vírus FHV, regiões denominadas daqui em diante (ver exemplo 3) FHV ORF2 e FHV ORF5, que se comprovou serem utilizáveis para a inserção de genes estranhos nas condições que permitem cumprir os objectivos expostos acima.

A presente invenção tem, portanto, por objectivo uma vacina viva recombinante utilizando como vector um herpesvírus felino compreendendo, e expressando, pelo menos, uma sequência nucleotídica que codifica para um polipéptido, estando esta sequência inserida no sítio ORF5 e/ou no sítio ORF2.

De preferência, a sequência inserida codifica para um polipéptido antigénico e, preferencialmente, para um polipéptido antigénico de um agente patogénico felino. Podem igualmente inserir-se sequências que codificam para proteínas imunomoduladoras tais como as citocinas. De acordo com uma modalidade vantajosa, pode associar-se uma sequência que codifica para uma citocina, ou análogo, e uma sequência que codifica para um antigénio. Se for necessário, várias sequências de citocinas podem estar associadas entre elas, eventualmente em combinação com uma das sequências que codificam para os antigénios.

A inserção nos dois sítios recentemente carac-

terizados é realizada pela inserção simples (sem deleção) ou após deleção parcial ou total das ORFs utilizadas como sítios de inserção.

De acordo com uma modalidade particularmente preferida da invenção, efectuam-se inserções e/ou deleções nos dois sítios descritos. Esta modalidade está particularmente adaptada à utilização de estirpes selvagens virulentas do vírus FHV-1 para a obtenção de recombinantes. Pode assim inserir-se, pelo menos, uma sequência nucleotídica em cada um dos sítios, ou ainda inserir apenas num sítio, de preferência ORF5, e remover todo ou parte do outro sítio.

De acordo com uma outra modalidade, que se aplica às estirpes vacinais atenuadas, se estarem limitadas, a inserção é efectuada num único de dois sítios, de preferência o sítio ORF5.

Os herpesvírus felinos de acordo com a invenção são, de preferência, os vírus FHV de tipo 1. pode utilizar-se, em particular, a estirpe FHV-1 CO em que a sequência da região genómica (ORF1 a ORF8) está indicada na lista de sequências sob a referência SEO ID N° 1 (ver também tabela 1 exemplo 3). O sítio ORF2 está situado entre os nucleótidos 1655 e 2596. O sítio ORF5 está situado entre os nucleótidos 5869 e 7113.

Para a expressão de genes estranhos inseridos no

genoma de FHV-1 de acordo com a presente invenção, utilizar-se-á, de preferência, um promotor eucariota forte, tal como, preferencialmente, um promotor CMV imediato precoce (IE). Por promotor CMV IE, entende-se, nomeadamente, um fragmento tal como dado nos exemplos na medida em que os seus subfragmentos conservam a mesma actividade promotora. o promotor CMV IE pode ser o promotor humano (HCMV IE) ou o promotor murino (MCMV IE), ou ainda um promotor CMV IE de uma outra origem, por exemplo do rato, da cobaia, ou do porco.

Poder-se-á inserir, pelo menos, duas sequências nucleotídicas num dos sítios ORF2 ou ORF5 sob o controlo de promotores diferentes. Poderá tratar-se de, nomeadamente, de promotores CMV IE de origens diferentes.

De acordo com um desenvolvimento vantajoso da invenção, associa-se ao promotor CMV IE um outro promotor de acordo com uma disposição invertida, de modo que os dois promotores têm as suas extremidades 5' adjacentes, se bem que as transcrições iniciadas a partir destes promotores se fazem em sentidos opostos, o que permite inserir, na região de inserção, duas sequências nucleotídicas, uma sob a dependência do promotor CMV IE, a outra sob a do promotor associado. Esta construção é notável pelo facto de que a presença do promotor CMV IE, e nomeadamente da sua parte activadora (estimulador), poder activar a transcrição induzida pelo promotor associado. Como promotor associado, pode citar-se, por exemplo, um promotor CMV de espécie

diferente do primeiro promotor. Pode-se visar, igualmente, outros promotores tais como o promotor RNA1.8 do vírus da doença de Marek (MDV) (G. Bradley *et al.* *J. Virol.* 1989. 63.2534-2542).

A sequência nucleotídica inserida no vector FHV para ser expressa pode ser toda a sequência que codifica para um polipéptido antigénico de um agente patogénico felino capaz de, uma vez expressa nas condições favoráveis procuradas pela invenção, assegurar uma imunização que conduz a uma protecção eficaz do animal vacinado contra o agente patogénico. Poder-se-á então inserir, nas condições descritas pela presente invenção, as sequências nucleotídicas que codificam para os antigénios de interesse para uma determinada doença.

O caso típico da invenção é a inserção de, pelo menos, uma sequência nucleotídica que codifica de forma conveniente um polipéptido do vírus da peritonite infecciosa felina (PIF ou FIPV) e, de preferência, o polipéptido FIPV M ou o polipéptido FIPV S modificado. Obtém-se assim uma vacina viva recombinante que assegura, adicionalmente uma protecção contra a rinotraqueíte infecciosa felina, uma protecção contra a peritonite infecciosa felina. Se for desejado, pode também inserir-se, adicionalmente ou em vez de, uma sequência que codifica para um outro antigénio do vírus PIF, tal como a proteína N, a proteína 7b, e/ou ainda os polipéptidos codificados pelo gene da polimerase (polB) do vírus da PIF.

Outros casos preferidos da invenção são a inserção de sequências nucleotídicas que codificam para os antígenos ou fragmentos de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV), em particular, os genes env, gag e pol (Osterhaus A. *et al.* *J. Immunol.*, 1985. 135. 591-596; Lutz H. *Vet. Microbiol.* 1990. 23. 131-146; Clark N. *et al.* *JAVMA*, 1991. 199. 1433-1443; Thomsen D. *et al.* *J. Gen. Virol.*, 1992. 73. 1819-1824), do vírus da imunodeficiência felina (FIV) (Jarrett O. *et al.* *AIDS*, 1990, 4 (supl. 1): S163-S165; Miyazawa T. *et al.* *Arch. Virol.*; 1994, 134, 221-234; de Rhonde A. *et al.* *Virology*, 1994. 198. 257-264), em particular, os genes env, gag e pol, do vírus da panleucopenia felina (FPV) (Carlson J. *et al.* *J. Virol.* 1985. 55. 574-582; Martyn J. *et al.* *J. Gen. Virol.* 1990. 71, 2747-2753), em particular, o gene da cápside VP2, do calicivírus felino (FCV) (Neill J. *et al.* *J. Virol.* 1991. 65. 5440-5447; Carter M. *et al.* *Virology*. 1992. 190. 443-448), em particular, o gene da cápside.

Um caso típico da invenção é uma vacina compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica para um antígeno do vírus da PIF sob o controlo de CMV IE e uma sequência nucleotídica que codifica para um antígeno de uma outra doença viral felina, nomeadamente as citadas mais acima, sob o controlo do outro promotor.

A presente invenção tem também por objectivo uma fórmula de vacina multivalente, compreendendo, em mistura

ou para misturar, pelo menos, duas vacinas vivas recombinantes tais como definido acima, compreendendo, estas vacinas, sequências inseridas diferentes, nomeadamente de patogénicos diferentes.

A presente invenção tem também por objectivo os vírus FHV modificados em um ou nos dois sítios ORF2 e ORF5 como indicado acima.

Ela tem também por objectivo um método de vacinação, em particular de gatos, no qual se administra por qualquer via parentérica ou local, mas de preferência por via oronasal, uma quantidade eficaz de uma vacina tal como acima definido. A dose vacinal estará compreendida entre 10^2 DICC50 e 10^7 DICC50. Tal como definido, a vacina é eficaz, em geral, após uma única administração por via oronasal. No entanto, as administrações repetidas podem ser necessárias.

A presente invenção tem também por objectivo os fragmentos de ADN compreendendo toda ou parte da sequência definida pelas posições 1 a 8193 na SEQ ID N° 1, nomeadamente toda ou parte dos sítios ORF2 e ORF5 definidos e/ou sequências flanqueantes localizadas a montante e a jusante destes sítios, fragmentos que serão úteis como braços flanqueantes para as técnicas de recombinação homóloga com o genoma do vírus FHV parental. Obviamente, a invenção refere-se também às variantes destes fragmentos que correspondem às sequências equivalentes das outras

estirpes de FHV. O especialista tem toda a liberdade para escolher as regiões que servem de braços flanqueantes em ligação com o tipo de inserção (com ou sem deleção) ou de deleção (parcial ou total) seleccionada. De uma maneira geral, os braços flanqueantes poderão, deste modo, possuir de 100 a 800 pares de bases.

A invenção vai ser agora descrita mais em detalhe com o auxílio de exemplos de realização não limitativos, utilizados com referência às figuras, nas quais:

Figura 1: Sequência da região FHV-1 (10803 pares de bases) e tradução das diferentes grelhas de leitura aberta (ORF) presentes nesta sequência (ORF1 a ORF8).

Figura 2: Construção do plasmídeo pPB107 (plasmídeo dador para a inserção de cassetes de vectores no sítio FHV-1 ORF2)

Figura 3: Construção do plasmídeo pPB110 (plasmídeo dador para a inserção de cassetes de vectores no sítio FHV-1 ORF5)

Figura 4: Construção da cassette de vectores para o gene FIPV M (plasmídeo pPB105)

Figura 5: Construção da cassette de vectores para o gene FIPV S (plasmídeo pPB055)

Figura 6: Mutagénese do sítio A1 do gene FIPV S (plasmídeo pJCA084)

Figura 7: Mutagénese do sítio A2 do gene FIPV S (plasmídeo pJCA085)

Figura 8: Mutagénese dos sítios A1 + A2 do gene FIPV S (= FIPV S*) (plasmídeo pJCA087)

Figura 9: Construção da cassette de vectores para o gene FIPV S * modificado (mutações nos sítios A1 e A2) (plasmídeo pPB056)

Figura 10: Construção da cassette de vectores para o gene FIPV N (plasmídeo pJCA091)

Figura 11: Construção do plasmídeo dador para a inserção da cassette de vectores do gene FIPV M no sítio FHV-1 ORF2 (pPB111)

Figura 12: Construção do plasmídeo dador para a inserção da cassette de vectores do gene FIPV S * no sítio FHV-1 ORF2 (pPB112)

Figura 13: Construção do plasmídeo dador para a inserção da cassette de vectores do gene FIPV N no sítio FHV-1 ORF2 (pPB113)

Figura 14: Construção do plasmídeo dador para a inserção da cassette de vectores do gene FIPV M no sítio FHV-1 ORF5 (pPB114)

Figura 15: Construção do plasmídeo dador para a inserção da cassette de vectores do gene FIPV S * no sítio FHV-1 ORF5 (pPB115)

Figura 16: Construção do plasmídeo dador para a inserção da cassette de vectores do gene FIPV N no sítio FHV-1 ORF5 (pPB116)

Lista das sequências SEQ ID para as construções nos sítios ORF2 e ORF5

- SEQ ID N° 1** Sequência completa da região FHV-1 ORF1 --> ORF8 representada na figura 1
- SEQ ID N° 2** Sequência de aminoácidos parcial ORF FHV-1 ORF1 da figura 1
- SEQ ID N° 3** Sequência de aminoácidos da ORF FHV-1 ORF2 da figura 1
- SEQ ID N° 4** Sequência de aminoácidos da ORF FHV-1 ORF3 da figura 1
- SEQ ID N° 5** Sequência de aminoácidos da ORF FHV-1 ORF4 da figura 1
- SEQ ID N° 6** Sequência de aminoácidos da ORF FHV-1 ORF5 da figura 1
- SEQ ID N° 7** Sequência de aminoácidos da ORF FHV-1 ORF6 da figura 1
- SEQ ID N° 8** Sequência de aminoácidos da ORF FHV-1 ORF7 da figura 1
- SEQ ID N° 9** Sequência de aminoácidos parcial da ORF FHV-1 ORF8 da figura 1
- SEQ ID N° 10** Oligonucleótido JCA054
- SEQ ID N° 11** Oligonucleótido JCA055
- SEQ ID N° 12** Oligonucleótido PB080
- SEQ ID N° 13** Oligonucleótido PB081
- SEQ ID N° 14** Oligonucleótido PB082
- SEQ ID N° 15** Oligonucleótido PB083
- SEQ ID N° 16** Oligonucleótido PB084
- SEQ ID N° 17** Oligonucleótido PB085
- SEQ ID N° 18** Oligonucleótido JCA056
- SEQ ID N° 19** Oligonucleótido JCA057
- SEQ ID N° 20** Oligonucleótido PB088

SEQ ID N° 21 Oligonucleótido PB089
SEQ ID N° 22 Oligonucleótido JCA058
SEQ ID N° 23 Oligonucleótido JCA059
SEQ ID N° 24 Oligonucleótido JCA060
SEQ ID N° 25 Oligonucleótido JCA061
SEQ ID N° 26 Oligonucleótido JCA062
SEQ ID N° 27 Oligonucleótido JCA063
SEQ ID N° 28 Oligonucleótido JCA064
SEQ ID N° 29 Oligonucleótido JCA065
SEQ ID N° 30 Oligonucleótido JCA066
SEQ ID N° 31 Oligonucleótido JCA067
SEQ ID N° 32 Oligonucleótido JCA068
SEQ ID N° 33 Oligonucleótido JCA069

2. EXEMPLOS

Todas as construções de plasmídeos foram realizadas utilizando as técnicas convencionais de biologia molecular descritas por Sambrook J. *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Edição. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. Nova Iorque. 1989). Todos os fragmentos de restrição utilizados pela presente invenção foram isolados utilizando o estojo ("kit") "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

O vírus utilizado como vírus parental é uma estirpe CO do herpesvírus felino de tipo 1 (FHV-1). Este vírus foi isolado a partir de células renais de um gatinho

recém nascido de uma mãe que sofria de rinotraqueíte infecciosa (C. Benoit Jeannin, Tese de Doutorado de 3º ciclo, Universidade de Lyon, 1983). As condições de cultura deste vírus foram já descritas (Fargeaud D. *et al.* *Arch. Virol.* 1984. 80. 69-82). Resumidamente, as células CRFK ("Crandell Rees Feline Kidney cells"), cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (meio "MEM) são inoculadas com uma estirpe FHV-1 CO utilizando uma multiplicidade de infecção de 1. As células infectadas são depois incubadas a 37 °C durante cerca de 36 horas, até ao aparecimento de um efeito citopático completo.

Exemplo 1: Extração do ADN do herpesvírus felino de tipo 1:

Após a cultura, o sobrenadante e as células lisadas são recolhidas e a totalidade da suspensão viral é centrifugada a 1 000 g durante 10 minutos a +4 °C para eliminar os resíduos celulares. As partículas virais são depois recolhidas por ultracentrifugação a 400 000 g durante 1 hora a +4 °C. O precipitado é recuperado num volume mínimo de tampão (Tris a 10 mM, EDTA a 1 mM). Esta suspensão viral concentrada é tratada por uma proteinase K (100 µg/mL final) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) (0,5% final) durante 2 horas a 37 °C. O ADN viral é depois extraído com uma mistura de fenol/clorofórmio, depois precipitada com 2 volumes de etanol absoluto. Após uma noite a -20 °C, o ADN é centrifugado a 10 000 g durante

15 minutos a +4 °C. O precipitado de ADN é seco, depois recuperado num volume mínimo de água ultrapura estéril.

Exemplo 2: Isolamento do ARN genómico da estirpe FIPV 79-1146 e clonagem do ADN complementar

A estirpe FIPV 79-1146 foi cultivada em células CRFK em meio DMEM (Gibco). O ARN viral genómico foi isolado utilizando a técnica de extracção com tiocianato de guanidina/fenol-clorofórmio (Chomczynski P. e Sacchi N., *Anal. Biochem.* 1987. 162. 156-159). Os oligonucleótidos específicos (portadores nas suas extremidades 5' de sítios de restrição para facilitar a clonagem dos fragmentos amplificados) foram sintetizados de modo a que possam cobrir inteiramente as regiões codificantes dos genes a serem amplificados (respectivamente M, S e N). A reacção de transcrição inversa (RT) e a amplificação em cadeia pela polimerase (PCR) foram efectuadas de acordo com as técnicas convencionais (Sambrook J. et al. 1989). Cada reacção de RT-PCR foi feita com um par de amplímeros específicos e utilizando como matriz o ARN genómico viral extraído. O ADN complementar amplificado foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) antes de ser digerido pelas enzimas de restrição.

Exemplo 3: Clonagem e caracterização da região FHV-1 ORF1 - ORF7 (fragmentos *Eco*R1 D e *Eco*RI F)

O ADN genómico purificado da estirpe CO do vírus

FHV-1 foi digerido por *EcoRI* e os fragmentos D (cerca de 9 200 pb) e F (7 600 pb) foram clonados no vector pBlueScript SKII+ para dar, respectivamente os plasmídeos pFHVEcoRID e pFHVEcoRIF. O plasmídeo pFHVEcoRID foi digerido por *EcoRI* e *PstI* e o fragmento *EcoRI-PstI* de 979 pb foi isolado e ligado com o vector pBS-SKII+, previamente digerido por *EcoRI* e *PstI* para dar o plasmídeo pPB050. O plasmídeo pFHVEcoRID foi digerido por *PstI* e o fragmento *PstI-PstI* de 2 388 pb foi isolado e ligado com o vector pBS-SKII+, previamente digerido por *PstI* para produzir o plasmídeo pPB051. as inserções contidas nos plasmídeos pFHVEcoRIF, pPB050 e pPB051 foram totalmente sequenciadas nas duas cadeias para produzir a sequência da figura 1 (SEQ ID N° 1).

Várias grelhas de leitura aberta de tamanho superior a 65 aminoácidos foram identificadas nesta sequência (figura 1).

A primeira grelha de leitura (ORF1) (posições 1 - 1587) é incompleta e codifica para uma proteína truncada de 529 aminoácidos (SEQ ID N° 2).

A segunda grelha de leitura (ORF2) (posições 1655 - 2596) codifica para um polipéptido de 314 aminoácidos (SEQ ID N° 3).

A terceira grelha de leitura (ORF3) (posições

2733 - 4094) está situada na cadeia complementar e codifica para um polipéptido de 454 aminoácidos (SEQ ID N° 4).

A quarta grelha de leitura (ORF4) (posições 4476 - 5660) codifica para um polipéptido de 395 aminoácidos (SEQ ID N° 5).

A quinta grelha de leitura (ORF5) (posições 5869 - 7113) codifica para um polipéptido de 415 aminoácidos (SEQ ID N°6).

A sexta grelha de leitura (ORF6) (posições 7449 - 8900) codifica para um polipéptido de 484 aminoácidos (SEQ ID N°7).

A sétima grelha de leitura identificada na sequência da figura 1 (ORF7) (posições 9153 - 9731) codifica para uma proteína de 193 aminoácidos (SEQ ID N° 8).

A oitava e última grelha de leitura identificada na sequência da figura 1 (ORF8) (posições 9908 - 10803) é incompleta. Está situada na cadeia complementar e codifica para uma proteína truncada de 298 aminoácidos (SEQ ID N° 9).

As diferentes grelhas de leitura aberta são reunidas na tabela a seguir: (Tabela 1)

Grelha de leitura aberta	Início - Fim (posições na figura 1)	Tamanho em aminoácidos
ORF 1	1 - 1587	529 aa
ORF 2	1655 - 2596	314 aa
ORF 3	4094 - 2733	454 aa
ORF 4	4476 - 5660	395 aa
ORF 5	5869 - 7113	415 aa
ORF 6	7449 - 8900	484 aa
ORF 7	9153 - 9731	193 aa
ORF 8	10803 - 9908	298 aa

Pensa-se que a grelha de leitura aberta FHV ORF2 recentemente caracterizada é homóloga do gene HSV-1 UL40 (RR2).

Exemplo 4: Construção do plasmídeo dador para o sítio FHV-1 ORF2 (pPB107) (figura nº 2)

O plasmídeo pFHVEcoRID foi digerido por EcoRI e SacII para isolar o fragmento *EcoRI-SacII* de 1509 pb. Um adaptador *KpnI-EcoRI* contendo o sítio *PmeI* foi obtido por hibridação dos 2 oligonucleótidos sintéticos seguintes:

JCA054 (24 mero) (SEQ ID Nº 10):

5' CTTGCCGGGGTTTAAACCGGTTTCG 3' e

JCA055 (32 mero) (SEQ ID Nº 11):

5' AATTCTGAACCGGTTTAAACCCCGGCAAGGTAC 3'

O fragmento *EcoRI*-*SacII* e o oligonucleótido de cadeia dupla foram ligados no vector pBS-SKII+, previamente digerido por *KpnI* e *SacII*, para produzir o plasmídeo pPB106 (4 407 pb). Um oligonucleótido sintético de cadeia dupla portador dos sítios de clonagem *HindIII*, *ClaI* e *ApaI* foi obtido por hibridação dos 2 oligonucleótidos seguintes:

PB080 (32 mero) (SEQ ID N° 12):

5' TGCAAAGCTTATCGATCCCGGGGCCCCGGTGCA 3' e

PB081 (32 mero) (SEQ ID N° 13):

5' CCGGGCCCCGGGATCGATAAGCTTTGCATGCA 3'

O oligonucleótido assim obtido foi ligado com o plasmídeo pPB106, previamente digerido por *PstI* (sítio único de pPB106) e tratado com uma fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pPB107 (4 439 pb) (figura n° 2). Este plasmídeo contém os braços flanqueantes 5' (*SacII*-*PstI* 530 pb) e 3' (*PstI*-*EcoRI* 979 pb) do sítio FHV-1 ORF2 assim como um sítio múltiplo de clonagem permite a inserção de uma cassete de vectores.

Exemplo 5: Construção do plasmídeo dador para o sítio FHV-1 ORF5 (pPB110) (figura n° 3)

O plasmídeo pFHV*EcoRI*F (ver exemplo 3) foi digerido por *SacI* e *SmaI* para isolar o fragmento *SacI*-*SmaI* de 1 367 pb. Um adaptador *SalI*-*KpnI* contendo o sítio *PmeI* foi obtido por hibridação dos 2 oligonucleótidos seguintes:

PB082 (21 mero) (SEQ ID N° 14):

5' GGGGGCCGTTTAAACCGGTAC 3'

PB083 (17 mero) (SEQ ID N° 15):

5' CGGTTTAAACGGCCCCC 3'

O oligonucleótido de cadeia dupla assim obtido e o fragmento *SacI-SmaI* 1367 pb foram ligados com o vector pBS-SKII+, previamente digerido por *KpnI* e *SacI* para produzir o plasmídeo pPB109 (4 247 pb). Um sítio múltiplo de clonagem foi obtido por hibridação dos 2 oligonucleótidos sintéticos seguintes:

PB084 (28 mero) (SEQ ID N° 16):

5' TCGAGAAAGCTTATCGATCCCGGGCCCG 3'

PB085 (28 mero) (SEQ ID N° 17):

5' TCGACGGGCCCCGGGATCGATAAGCTTTC 3'

O oligonucleótido cadeia dupla assim obtido foi ligado com o plasmídeo pPB109, previamente digerido por *SalI* e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pPB110 (4 275 pb) (figura n° 3).

O plasmídeo contém os braços flanqueantes 5' (*SacI-SalI* 699 pb) e 3' (*SalI-SmaI* 668 pb) do sítio FHV-1 ORF5 assim como um sítio múltiplo de clonagem permitindo a inserção de uma cassette de vectores.

Exemplo 6: Construção da cassete de vectores para o gene FIPV M (figura n ° 4)

Uma reacção de RT-PCR foi realizada com o ARN genómico da estirpe FIPV 79-1146 e com os oligonucleótidos seguintes:

JCA056 (40 mero) (SEQ ID N°18)

5' TTTGAGCTCGCGGCCGCATGAAGTAATTTTGCTAATACTC 3'

JCA057 (27 mero) (SEQ ID N° 19)

5' TTTGGTACCGTTTAGTTACACCATATG 3'

com vista ao isolamento precisamente do gene que codifica para a glicoproteína de membrana (FIPV M) sob a forme de uma cassete *SacI*-*KpnI*. Após purificação, o produto de RT-PCR de 823 pb foi digerido por *KpnI* e *SacI* para isolar um fragmento *KpnI*-*SacI* de 813 pb. Este fragmento foi ligado com o vector pBS-SKII+, previamente digerido com *KpnI* e *SacI*, para produzir o vector pJCA080 (3 668 pb). A sequência do gene M foi verificada por sequenciação e verificou-se ser idêntica à anteriormente publicada (Vennema H. *et al. Virology*. 1991. 181. 327-335), sequência que é incorporada por referência no presente pedido.

O plasmídeo pCMVb (CLONTECH) foi digerido por *EcoRI* e *NotI* para isolar o fragmento *EcoRI*-*NotI* de 819 pb contendo a região promotora do gene imediato precoce do citomegalovírus humano (fragmento A). O plasmídeo pJCA080

foi digerido por *KpnI* e *NotI* para isolar o fragmento *NotI-KpnI* (gene FIPV M) de 804 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram então ligados com o vector pGEM-7Zf + (Promega), previamente digerido por *EcoRI* e *KpnI*, para produzir o plasmídeo pPB104 (4 614 pb).

Uma reacção de PCR foi realizada com os oligonucleótidos seguintes:

PB088 (30 mero) (SEQ ID N° 20)

5' TTGGGTACCGCCTCGACTCTAGGCGGCCGC 3'

PB089 (32 mero) (SEQ ID N° 21)

5' TTGGGTACCGGATCCGAAAAACCTCCCACAC 3'

e a matriz pCMVb para produzir um fragmento de 252 pb contendo o sinal de poliadenilação do gene precoce do vírus SV40. Este fragmento foi digerido por *KpnI* para isolar o fragmento *KpnI-KpnI* de 233 pb (fragmento B). Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pPB104, previamente digerido por *KpnI* e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pPB105 (4 847 pb) (figura nº 4). Este plasmídeo contém uma cassette de vectores com o promotor HCMVIE - gene FIPV M - poliA SV40 mobilizável por digestão com *ApaI-ClaI* ou *ApaI-HindIII*.

Exemplo 7: Construção da cassette de vectores para o gene FIPV S (figura nº 5)

Uma reacção de RT-PCR foi realizada com o ARN

genômico da estirpe FIPV 79-1146 e com os oligonucleótidos seguintes:

JCA058 (39 mero) (SEQ ID N° 22)

5' TTTGAGCTCGCGCCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC 3'

JCA059 (38 mero) (SEQ ID N° 23)

5' TTTGGTACCGTTTAGTGGACATGCACTTTTTCAATTGG 3'

com vista ao isolamento precisamente do gene que codifica para a glicoproteína espícula (ou "spike" ou ainda designada a seguir "S") (FIPV S). Após purificação, o produto de RT-PCR de 4 387 pb foi digerido por *KpnI* e *SacI* para isolar um fragmento *KpnI-SacI* de 4 375 pb. Este fragmento foi ligado com o vector pBS-SKII+, previamente digerido com *KpnI* e *SacI*, para produzir o vector pJCA081 (7 234 pb). A sequência do gene S foi verificada por sequenciação e verificou-se ser idêntica à essa previamente publicada (de Groot R. et al. *J. Gen. Virol.* 1987. 68. 2639-2646), sequência que é incorporada por referência no presente pedido.

O plasmídeo pCMVb foi digerido por *EcoRI* e *NotI* para isolar o fragmento *EcoRI-NotI* de 819 pb contendo a região promotora do gene imediato precoce do citomegalovírus humano (fragmento A). O plasmídeo pJCA081 foi digerido por *KpnI* e *NotI* para isolar o fragmento *NotI-KpnI* (gene FIPV S) de 4 372 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram então ligados com o vector pGEM-7Zf +, previamente digerido por *EcoRI* e *KpnI*, para produzir o plasmídeo pJCA082 (8 180 pb).

Uma reacção de PCR foi realizada com os oligonucleótidos seguintes:

PB088 (SEQ ID N° 20) e PB089 (SEQ ID N° 21) (ver exemplo 6) e a matriz pCMVb para produzir um fragmento de 252 pb contendo o sinal de poliadenilação do gene precoce do vírus SV40. Este fragmento foi digerido por *KpnI* para isolar o fragmento *KpnI*-*KpnI* de 233 pb (fragmento B).

Este fragmento foi ligado com o plasmídeo pJCA082, previamente digerido por *KpnI* e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pPB055 (8 413 pb) (figura n° 5). Este plasmídeo contém uma cassette de vectores com o promotor HCMV-IE - gene FIPV S - poliA SV40 mobilizável por digestão *ApaI*-*ClaI*.

Exemplo 8: Construção do gene spike modificado (FIPV S*)

A sequência do gene FIPV S foi sujeita a mutagénese de maneira a modificar as regiões responsáveis pela indução de anticorpos facilitadores, sem alterar as funções da glicoproteína S. Esta modificação foi já descrita no pedido de patente FR-94 10379 (publicação N° 2 724 385), aqui incorporado por referência, e foi realizada da maneira seguinte:

8.1.: Mutagénese do sítio A1 (figura nº 6)

O fragmento central do gene FIPV S *HindIII*-*HindIII* de 1723 pb (nucleótidos 1696 a 3418) foi clonado no vector pBS-SKII +, previamente digerido por *HindIII* e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pJCA083 (4 678 pb). O sítio A1 está situado no subfragmento *HindIII*-*SspI* (posições 1696 a 1845) deste fragmento.

O sítio A1 foi sujeito a mutagénese por PCR utilizando a estratégia seguinte: Os oligonucleótidos seguintes foram sintetizados:

JCA060 (95 mero) (SEQ ID N° 24)

5'ATGAAGCTTAGTGGTTATGGTCAACCCATAGCCTCGACACTAAGTAA
CAT CACACTACCAATGCAGGATAACAATACTGTTGTGTACTGTATTCTG 3'

JCA061 (88 mero) (SEQ ID N° 25)

5'AAAAATATTGTACCATAAAGAACTTTTGCAAGTGGAATGAACATAAA
CTG AGAATTGGTTAGAACGAATACAGTACACAACAGTATTG 3'

JCA062 (20 mero) (SEQ ID N° 26)

5' ATGAAGCTTAGTGGTTATGG 3'

JCA063 (20 mero) (SEQ ID N° 27)

5' AAAAATATTGTACCATAAAG 3'

Os oligonucleótidos JCA060 e JCA061 foram hibridados entre eles graças à sua sequência complementar

comum de 23 pares de bases. O híbrido assim obtido foi utilizado, após alongamento das suas extremidades 3', como matriz para uma reacção de PCR utilizando os oligonucleótidos JCA062 e JCA063. Esta reacção de amplificação por PCR permitiu obter um fragmento de 159 pb. Este fragmento foi digerido por *HindIII* e *SspI* para produzir um fragmento *HindIII-SspI* de 149 pb (fragmento A). Este fragmento contém o sítio A1 modificado em duas posições (Val no lugar de Asp na posição 568 e Tyr no lugar de Asp na posição 591). O plasmídeo pJCA083 foi digerido por *HindIII* e digerido parcialmente por *SspI* para isolar o fragmento *SspI-HindIII* de 1 569 pb (fragmento B) por Geneclean (BIO101 Inc., La Jolla. Ca.).

O vector pBS-SKII+ foi digerido por *HindIII* e tratado com a fosfatase alcalina para produzir o fragmento C (2 960 pb).

Os fragmentos A, B e C foram a seguir ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pJCA084 (4 678 pb) (figura nº 6). Este plasmídeo contém o fragmento *HindIII-HindIII* do gene FIPV S modificado por dois aminoácidos do sítio A1.

O gene FIPV S pode ser a seguir reconstituído substituindo o fragmento *HindIII-HindIII* natural (posições 1696 a 3418) pelo fragmento *HindIII-HindIII* contido no plasmídeo pJCA084. O gene completo FIPV S modificado no sítio A1 pode então ser utilizado por construções de plasmídeos de vectores ou de vírus recombinantes.

8.2.: Mutagénese do sítio A2 (figura nº 7)

Os oligonucleótidos seguintes foram sintetizados:

JCA064 (20 mero) (SEQ ID Nº 28)

5' GGACAATATTTTAAATCAAG 3'

JCA065 (36 mero) (SEQ ID Nº 29)

5' TTTAACAACCTGCTCATTGGTTCCTGTACGTGCAGC 3'

JCA066 (36 mero) (SEQ ID Nº 30)

5' AAGTTTTATGTTGCTGCACGTACAGGAACCAATGAG 3'

JCA067 (20 mero) (SEQ ID Nº 31)

5' ATCACTAACATTTTAAAGC 3'

Uma reacção de PCR (PCR A) foi realizada com os oligonucleótidos JCA064 e JCA065 e com o plasmídeo pJCA083 como matriz para sintetizar um fragmento de PCR de 199 pb (fragmento A).

Uma reacção de PCR (PCR B) foi realizada com os oligonucleótidos JCA066 e JCA067 e com o plasmídeo pJCA083 como matriz para produzir um fragmento de PCR de 273 pb (fragmento B).

Os fragmentos de PCR A e B foram hibridados entre eles graças à sua região complementar de 46 pb e o produto desta hibridação, após alongamento das extremidades 3', foi amplificado por uma reacção de PCR (PCR C) com os oligonucleótidos JCA064 e JCA067 para produzir um fragmento

de PCR de 424 pb. Este fragmento de PCR foi digerido por *SspI* e *DraI* para produzir o fragmento de restrição *SspI-DraI* de 402 pb (fragmento C).

O plasmídeo pJCA083 foi digerido por *HindIII* e *SspI* para isolar o fragmento *HindIII-SspI* de 149 pb (fragmento D).

O plasmídeo pJCA083 foi digerido por *HindIII* e *DraI* para isolar o fragmento de restrição *DraI-HindIII* de 1170 pb (fragmento E).

O vector pBS-SKII + foi digerido por HindIII e tratado com a fosfatase alcalina para produzir o fragmento F (2960 pb).

Os fragmentos C, D, E e F foram a seguir ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pJCA085 (4 678 pb) (figura nº 7). O fragmento central *HindIII-HindIII* 1 723 pb do gene FIPV S contido em pJCA085 possui um sítio A2 modificado ao nível de 3 aminoácidos (Tyr no lugar de Asp na posição 643, Gly no lugar de Arg na posição 649, e Lys no lugar de Arg na posição 656).

O gene FIPV S pode ser a seguir reconstituído substituindo o fragmento *HindIII-HindIII* natural (posições 1696 a 3418) por o fragmento *HindIII-HindIII* contido no plasmídeo pJCA085. O gene completo de FIPV S modificado no sítio A2 pode ser então utilizado para construções de plasmídeos de vectores ou de vírus recombinantes.

8.3.: Mutagénese dos sítios A1 e A2 (figura nº 8)

Os fragmentos A (exemplo 8.1), C e E (exemplo 8.2) foram ligados com o vector pBS-SKII+, previamente digerido por *Hind*III e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pJCA085. O fragmento central *Hind*III-*Hind*III de 1 723 pb do gene FIPV S contido em pJCA085 apresenta 2 alterações de aminoácidos ao nível do sítio A1 (ver exemplo 8.1) e 3 alterações de aminoácidos ao nível do sítio A2 (ver exemplo 8.2).

O plasmídeo pJCA081 (exemplo 7) foi digerido por *Hind*III para isolar o fragmento *Hind*III-*Hind*III de 5 511 pb (fragmento A). O plasmídeo pJCA085 foi digerido por *Hind*III para isolar o fragmento *Hind*III-*Hind*III de 1 723 pb (apresentando 5 alterações de aminoácidos em relação à sequência da estirpe FIPV 79-1146) (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pJCA087 (7 234 pb) (figura nº 8). Este plasmídeo contém o gene FIPV S modificado ao nível dos sítios A1 e A2 (= gene FIPV S*).

8.4. Construção da cassette de vectores para o gene FIPV S* (figura nº9)

O plasmídeo pCMVb foi digerido por *Eco*RI e *Not*I para isolar o fragmento *Eco*RI-*Not*I de 819 pb contendo a região promotora do gene imediato precoce do citomegalo-

vírus humano (fragmento A). O plasmídeo pJCA087 (exemplo 8.3) foi digerido por *KpnI* e *NotI* para isolar o fragmento *NotI-KpnI* (gene FIPV S) de 4 372 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram então ligados com o vector pGEM-7Zf+, previamente digerido por *EcoRI* e *KpnI*, para produzir o plasmídeo pJCA088 (8180 pb).

Uma reacção de PCR foi realizada com os oligonucleótidos seguintes:

PB088 (SEQ ID N° 20) e PB089 (SEQ ID N° 21) (ver exemplo 6) e a matriz pCMVb para produzir um fragmento de 252 pb contendo o sinal de poliadenilação do gene precoce do vírus SV40. Este fragmento foi digerido por *KpnI* para isolar o fragmento *KpnI-KpnI* de 233 pb (fragmento B).

Este fragmento foi ligado com o plasmídeo pJCA088, previamente digerido por *KpnI* e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pPB056 (8 413 pb) (figura n° 9). Este plasmídeo contém uma cassette de vectores promotor HCMV-IE - gene FIPV S* - polyA SV40 mobilizável por digestão *ApaI-ClaI*.

Exemplo 9: Construção da cassette de vectores para o gene FIPV N (figura n° 10)

Uma reacção de RT-PCR foi realizada com o ARN genómico da estirpe FIPV 79-1146 e com os oligonucleótidos seguintes:

JCA068 (37 mero) (SEQ ID N° 32)

5' TTTGAGCTCGCGGCCGCATGGCCACACAGGGACAACG 3'

JCA069 (33 mero) (SEQ ID N° 33)

5' TTTGGTACCGTTTAGTTCGTAACTCATCAATC 3'

para isolar precisamente o gene que codifica para a proteína de nucleocápside "N" (FIPV N). Após purificação, o produto de RT-PCR de 1 161 pb foi digerido por *KpnI* e *SacI* para isolar um fragmento *SacI-KpnI* de 1 148 pb. Este fragmento foi ligado com o vector pBS-SKII +, previamente digerido com *KpnI* e *SacI*, para produzir o vector pJCA089 (4 007 pb). A sequência do gene N foi verificada por sequenciação e verificou-se ser idêntica à anteriormente publicada (Vennema H. *et al.* *Virology*. 1991. 181. 327-335), sequência que é aqui incorporada por referência no presente pedido.

O plasmídeo pCMVb (CLONTECH) foi digerido por *EcoRI* e *NotI* para isolar o fragmento *EcoRI-NotI* de 819 pb contendo a região promotora do gene imediato precoce do citomegalovírus humano (fragmento A). O plasmídeo pJCA089 foi digerido por *KpnI* e *NotI* para isolar o fragmento *NotI-KpnI* (gene FIPV N) de 1 137 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados com o vector pGEM-7Zf+, previamente digerido por *EcoRI* e *KpnI*, para produzir o plasmídeo pJCA090 (4 953 pb).

Uma reacção de PCR foi realizada com os oligonucleótidos seguintes:

PB088 (SEQ ID N° 20) e PB089 (SEQ ID N° 21) (exemplo 6) e a matriz pCMVb para produzir um fragmento de 252 pb contendo o sinal de poliadenilação do gene precoce do vírus SV40. Este fragmento foi digerido por *KpnI* para isolar o fragmento *KpnI-KpnI* de 233 pb (fragmento B). Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pJCA090, previamente digerido por *KpnI* e tratado com a fosfatase alcalina, para produzir o plasmídeo pJCA091 (5 186 pb) (figura n° 10). Este plasmídeo contém uma cassete de vectores promotor HCMV-IE - gene FIPV N - poliA SV40 mobilizável por digestão com *ApaI-ClaI* ou *ApaI-HindIII*.

Exemplo 10: Construção do plasmídeo dador pPB111 e isolamento de vFHV01 (figura n°11)

O plasmídeo pPB105 (exemplo 6, figura n°4) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaI-HindIII* de 1 925 pb (fragmento A). O plasmídeo pPB107 (exemplo 4, figura n° 2) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaI-HindIII* de 4 419 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pPB111 (6 332 pb) (figura n° 11).

Este plasmídeo contém a cassete de vectores HCMV-IE/gene FIPV M/poliA SV40 no sítio FHV ORF2.

O plasmídeo pPB111 foi linearizado por digestão

com *PmeI*, extraído com uma mistura de fenol-clorofórmio, precipitado com etanol absoluto, depois recuperado em água estéril.

As células CRFK, que formam um tapete celular bem estabelecido em caixa de Petri (Corning 4,5 cm de diâmetro) foram a seguir transfectadas com a mistura seguinte:

1 µg de plasmídeo pPB111 linearizado + 5 µg de ADN viral de FHV-1 em 300 µL de meio MEM e 100 µg de LipofectAMINE (Gibco-BRL Cat# 18324-012) diluídos em 300 µL de meio (volume final da mistura = 600 µL). Estes 600 µL foram a seguir diluídos em 3 mL (volume final) de meio MEM e colocados sobre 3×10^6 células CRFK. A mistura foi deixada em contacto com as células durante 5 horas, depois eliminada e substituída por 5 mL de meio de cultura. As células foram então deixadas em cultura durante 24 horas a +37 °C. Após 24 horas a 48 horas de cultura, 1 mL de sobrenadante de cultura foi recolhido e várias diluições deste sobrenadante foram utilizados para infectar novas células CRFK (cultivadas em caixa de Petri (Corning 4,5 cm de diâmetro) de maneira a obter placas isoladas, sendo cada caixa infectada com 1 mL de uma diluição do sobrenadante inicial. Após um contacto de 1 hora a 37 °C, o meio de infecção foi eliminado e substituído por 5 mL de meio MEM com 1% de agarose, mantido em sobrefusão a 42 °C. quando a agarose foi solidificada, as caixas foram incubadas 48 horas a 37°C em estufa de CO₂ até ao aparecimento de placas. A camada de agarose foi então eliminada e foi realizada uma transferência das placas virais numa membrana

estéril de nitrocelulose do mesmo diâmetro que a caixa de Petri que serviu à cultura. Esta membrana foi ela própria transferida para uma outra membrana de nitrocelulose de maneira a obter uma "cópia" invertida da primeira transferência. As placas transferidas para esta última cópia foram então hibridadas, de acordo com as técnicas normais conhecidas do especialista da técnica, com um fragmento do gene FIPV M marcado com digoxigenina (DNA Labelling Estojo ("kit"), Boehringer Mannheim, CAT # 1175033). Após a hibridação, as lavagens e colocação em contacto com o substrato de revelação, a membrana de nitrocelulose foi colocado em contacto com um filme autorradiográfico. As imagens de hibridação positiva nesta membrana indicaram que estas eram as placas que continham vírus FHV recombinantes tendo inserida a cassete FIPV M. As placas correspondentes a estas placas positivas foram retiradas de forma estéril para a primeira membrana de nitrocelulose, colocadas num tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de meio MEM e sonicadas para libertar os viriões da membrana. O meio contido no tubo Eppendorf foi a seguir diluído em meio MEM e as diluições assim obtidas serviram para infectar novas culturas de células CRFK. Um vírus recombinante, contendo a cassete HCMV-IE/FIPV M/poliA inserida no sítio ORF2, pura a 100% foi assim isolada após 3 ciclos de purificação e foi chamado vFHV01. A homologia da recombinação foi verificada por PCR utilizando oligonucleótidos situados de parte e de outro do sítio de inserção. A ausência de manipulação no genoma do vírus recombinante vFHV01, para lá da região de recombinação, foi verificada pela técnica de transferência de Southern.

Exemplo 11: Construção do plasmídeo dador pPB112 e isolamento de vFHV02 (figura nº 12)

O plasmídeo pPB056 (exemplo 8.4, figura nº 9) foi digerido por *ApaI* e *ClaI* para isolar o fragmento *ApaI-ClaI* de 5 466 pb (fragmento A). O plasmídeo pPB107 (exemplo 4, figura nº 2) foi digerido por *ApaI* e *ClaI* para isolar o fragmento *ApaI-ClaI* de 4 426 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pPB112 (9 898 pb) (figura nº 12). Este plasmídeo contém a cassette de vectores (HCMV-IE/gene FIPV S*/poliA SV40) no sítio FHV-1 ORF2.

As células CRFK foram transfectadas com uma mistura de plasmídeo pPB112 (linearizado por *PmeI*) e de ADN viral de FHV-1 como descrito no exemplo 10. Uma placa viral positiva para a cassette HCMV-IE/gene FIPV S* foi purificada como descrito no exemplo 10, mas utilizando uma sonda homóloga FIPV S*, e amplificada para produzir o vírus recombinante vFHV02.

Exemplo 12: Construção do plasmídeo dador pPB113 e isolamento de vFHV03 (figura nº 13)

O plasmídeo pJCA091 (exemplo 9, figura nº 10) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaIHindIII* de 2 244 pb (fragmento A). O plasmídeo pPB107 (exemplo 4, figura nº 2) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaI-HindIII* de 4 419 pb (fragmento

B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pPB113 (6671 pb) (figura nº13).

Este plasmídeo contém a cassette de vectores (HCMV-IE/gene FIPV N/políA SV40) no sítio FHV-1 ORF2.

As células CRFK foram transfectadas com uma mistura de plasmídeo pPB113 (linearizado por *PmeI*) e de ADN viral de FHV-1 como descrito no exemplo 10. Uma placa viral positiva para a cassette HCMV-IE/gene FIPV N foi purificada como descrito no exemplo 10, mas utilizando uma sonda homóloga FIPV N, e amplificada para produzir o vírus recombinante vFHV03.

Exemplo 13: Construção do plasmídeo dador pPB114 e isolamento de vFHV04 (figura nº 14)

O plasmídeo pPB105 (exemplo 6, figura nº 4) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaI-HindIII* de 1925 pb (fragmento A). O plasmídeo pPB110 (exemplo 5, figura nº 3) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaI-HindIII* de 4 256 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pPB114 (6 169 pb) (figura nº 14). Este plasmídeo contém a cassette de vectores (HCMV-IE/gene FIPV M/políA SV40) no sítio FHV-1 ORF5.

As células CRFK foram transfectadas com uma mistura de plasmídeo pPB114 (linearizado por *PmeI*) e de ADN viral de FHV-1 como descrito no exemplo 10. Uma placa viral

positiva para a cassette HCMV-IE/gene FIPV M foi purificada como descrito no exemplo 10 e amplificada para produzir o vírus recombinante vFHV04.

Exemplo 14: Construção do plasmídeo dador pPB115 e isolamento de vFHV05 (figura nº 15)

O plasmídeo pPB056 (exemplo 8.4, figura nº 9) foi digerido por *ApaI* e *ClaI* para isolar o fragmento *ApaI-ClaI* de 5 466 pb (fragmento A). O plasmídeo pPB110 (exemplo 5, figura nº 3) foi digerido por *ApaI* e *ClaI* para isolar o fragmento *ApaI-ClaI* de 4 263 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pPB115 (9 735 pb) (figura nº 5). Este plasmídeo contém a cassette de vectores (HCMV-IE/gene FIPV S*/poliA SV40) no sítio FHV-1 ORF5.

As células CRFK foram transfectadas com uma mistura de plasmídeo pPB115 (linearizado por *PmeI*) e de ADN viral de FHV-1 como descrito no exemplo 10. Uma placa viral positiva para a cassette HCMV-IE/gene FIPV S* foi purificada como descrito no exemplo 10, mas utilizando uma sonda homóloga FIPV S*, e amplificada para produzir o vírus recombinante vFHV05.

Exemplo 15: Construção do plasmídeo dador pPB116 e isolamento de vFHV06 (figura nº 16)

O plasmídeo pJCA091 (exemplo 9, figura nº 10) foi digerido por *ApaI* e *HindIII* para isolar o fragmento *ApaI-*

*Hind*III de 2 244 pb (fragmento A). O plasmídeo pPB110 (exemplo 5, figura nº 3) foi digerido por *Apa*I e *Hind*III para isolar o fragmento *Apa*I-*Hind*III de 4 256 pb (fragmento B). Os fragmentos A e B foram ligados conjuntamente para produzir o plasmídeo pPB116 (6 508 pb). Este plasmídeo contém a cassette de vectores (HCMV-IE/gene FIPV N/poliA SV40) no sítio FHV-1 ORF5.

As células CRFK foram transfectadas com uma mistura de plasmídeo pPB116 (linearizado por *Pme*I) e de ADN viral de FHV-1 como descrito no exemplo 10. Uma placa viral positiva para a cassette HCMV-IE/gene FIPV N foi purificada como descrito no exemplo 10, mas utilizando uma sonda homóloga FIPV N, e amplificada para produzir o vírus recombinante vFHV06.

Exemplo 16: Construção de plasmídeos dadores para a inserção de cassetes de vectores no sítio ORF2 de FHV-1

De acordo com a mesma estratégia descrita acima para a inserção de cassetes de vectores (genes colocados sob o controlo de promotores HCMV-IE ou MCMV-IE ou promotor duplo MCMV-IE/RNA 1,8 kpb) no sítio ORF2, é possível construir herpesvírus felinos recombinantes que expressam a um nível elevado imunogénios do calicivírus felino (FCV), do vírus da panleucopenia felina (FPV), do vírus da leucemia felina (FeLV), do vírus da imunodeficiência felina (FIV), ou de outros patogénicos felinos, ou ainda citocinas felinas.

Exemplo 17: Construção de plasmídeos dadores para a inserção de cassetes de vectores no sítio ORF5 de FHV-1

De acordo com a mesma estratégia descrita acima para a inserção de cassetes de vectores (genes colocados sob o controlo de promotores HCMV-IE ou MCMV-IE ou promotor duplo MCMV-IE/RNA 1,8 kpb) no sítio de ORF5, é possível construir herpesvírus felinos recombinantes que expressam a um nível elevado imunogénios vírus FCV, FPV, FeLV, FIV, ou outros patogénicos felinos, ou ainda citocinas felinas.

Exemplo 18: Produção de vacinas

Para produzir uma vacina, os vírus recombinantes obtidos de acordo com a invenção são cultivadas em células CRFK. A recolha do vírus recombinante faz-se quando o efeito citopático é completo. As células lisadas e o sobrenadante de cultura são recolhidos. Após clarificação do lisado celular para eliminar os resíduos celulares, a solução viral é titulada A solução viral é a seguir diluída numa solução estabilizadora para a liofilização, repartida numa razão de uma dose vacinal (10^2 DICC50 a 10^7 DICC50) por frasco, e enfim liofilizada.

Lisboa, 3 de Abril de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina viva recombinante compreendendo, como vector, um herpesvírus felino compreendendo e expressando, pelo menos, uma sequência nucleotídica que codifica para um polipéptido, estando esta sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2 de FHV, sítios que, no sítio FHV-1 CO, apresentam as sequências nucleotídicas de posições respectivas 5 869-7 113 e 1 655-2 596 na SEQ ID NO: 1.

2. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a ou as sequências nucleotídicas estarem inseridas nos sítios ORF5 e/ou ORF2 por inserção simples, ou após deleção total ou parcial destes sítios.

3. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a ou as sequências nucleotídicas estarem inseridas num dos sítios ORF5 ou ORF2, e por uma deleção ser realizada noutro destes sítios.

4. Vacina viva recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizada por**, para expressar a sequência inserida, o vector compreende um promotor eucariota forte.

5. Vacina viva recombinante de acordo com a

reivindicação 4, **caracterizada por o** promotor forte ser um promotor CMV imediato precoce, de preferência o promotor CMV imediato precoce de muríneo ou humano.

6. Vacina viva recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, **caracterizada por** compreender, pelo menos, duas sequências nucleotídicas inseridas no sítio ORF5 ou ORF2 sob o controle de promotores eucariotas diferentes.

7. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** os promotores eucariotas serem promotores CMV imediato precoce de origens animais diferentes.

8. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** compreender uma primeira sequência nucleotídica associada ao promotor CMV imediato precoce e uma outra sequência nucleotídica associada a um outro promotor, tendo os dois promotores as suas extremidades 5' adjacentes.

9. Vacina viva recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, **caracterizada por** compreender uma sequência nucleotídica que codifica para um polipéptido antigénico, estando esta sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2.

10. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** compreender uma sequência nucleotídica que codifica para um polipéptido antigénico de um agente patogénico felino, estando esta sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2.

11. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** compreender uma sequência que codifica para um antigénio seleccionado entre o grupo de antigénios do vírus da peritonite infecciosa felina, do vírus da leucemia felina, do vírus da imunodeficiência felina, do vírus da panleucopenia infecciosa felina e do calicivírus felino, estando esta sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2.

12. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** compreender uma sequência nucleotídica, seleccionada de entre as sequências nucleotídicas que codificam para os polipéptidos M, S modificado ou N de FIPV, estando esta sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2.

13. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** compreender, pelo menos, uma sequência nucleotídica seleccionada de entre o grupo de sequências correspondentes aos antigénios env, gag, pol do vírus da leucemia felina, aos antigénios env, gag, pol do vírus da imunodeficiência felina, ao antigénio

da cápside VP2 do vírus da panleucopenia infecciosa felina, ao antígeno da cápside do calicivírus felino, aos antígenos M, S modificado, N, 7b, polimerase do vírus da peritonite infecciosa felina.

14. Vacina viva recombinante de acordo com o conjunto das reivindicações 8 e 12, **caracterizado por** a sequência nucleotídica inserida sob o controlo do promotor CMV imediato precoce ser uma sequência nucleotídica que codifica para o polipéptido M, N ou S modificado do vírus FIPV e por a sequência nucleotídica inserida sob o controlo do promotor associado ser uma sequência nucleotídica que codifica para um antígeno de uma outra doença felina.

15. Vacina viva recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 14, **caracterizada por** compreender uma sequência nucleotídica que codifica para um polipéptido imunomodulador, estando esta sequência inserida nos sítios ORF5 e/ou ORF2.

16. Vacina viva recombinante de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada por** esta sequência nucleotídica ser seleccionada de entre o grupo das sequências que codificam para as citocinas.

17. Fórmula de vacina multivalente compreendendo, em mistura ou a misturar, pelo menos, duas vacinas vivas recombinantes tais como definidas em qualquer das

reivindicações 1 a 16, compreendendo estas vacinas sequências inseridas diferentes.

18. Fragmento de ADN compreendendo, pelo menos, uma sequência seleccionada no grupo constituído por:

- a sequência definida pelas posições 1 a 8 193 na SEQ ID NO:1;

- a sequência do sítio ORF2 definida pelas posições 1 655 a 2 596 na SEQ ID NO:1;

- a sequência do sítio ORF5 definida pelas posições 5 869 a 7 113 na SEQ ID NO:1;

- as sequências flanqueantes de 100 a 800 pb situadas a montante e a jusante do sítio ORF2 na SEQ ID NO:1;

- as sequências flanqueantes de 100 a 800 pb situadas a montante e a jusante do sítio ORF5 na SEQ ID NO:1

19. Utilização de uma vacina de acordo com qualquer das reivindicações 1-16 ou de uma fórmula de vacina de acordo com a reivindicação 17 para a preparação de uma vacina para gatos destinada a uma administração por via parentérica ou local.

20. Utilização de acordo com a reivindicação 19, na qual a referida vacina para gatos é destinada a uma administração por via oronasal.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 19 ou 20, na qual a dose vacinal é 10^2 DICC50 a 10^7 DICC50.

22. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 19-21, na qual a referida vacina para gatos é destinada a uma administração numa única vez.

Lisboa, 3 de Abril de 2009

PstI

1 CTGCAGAATTTCAACAAAAAACTGTCTAAGGAATGTACAAAGGGTGTGCTTCCCTTTTGAAG
 1▶ LeuGlnAsnPheAsnLysLysLeuSerLysGluCysThrLysGlyValLeuProLeuLeuLys
 64 CTAATCGATCCCATGACAATAGCCATCAACAGCGACACAGACCGTCCCACTGGTGTATGTATA
 22▶ LeuLeuAspProMetThrIleAlaIleAsnSerAspThrAspArgProThrGlyValCysIle
 127 TACGTAGAACCCCTGGCATGCCGATATCAGATCGATATTAAATATGCGGGGAATGCTCGCATCG
 43▶ TyrValGluProTrpHisAlaAspIleArgSerIleLeuAsnMetArgGlyMetLeuAlaSer
 190 GATGAAAACCTCCAGATGTGATAATATATTTAGCTGTTTATGGACCCCGGACCTATTCTTCGAT
 64▶ AspGluAsnSerArgCysAspAsnIlePheSerCysLeuTrpThrProAspLeuPhePheAsp
 253 AGGTATCAACGGCACCTAGGCGGAGAGGTAATGTCAATTTGGACTCTATTGATGATGCCGCA
 85▶ ArgTyrGlnArgHisLeuGlyGlyGluValAsnValIleTrpThrLeuPheAspAspAlaAla
 316 TCCCATCTTTTCGAAGCTTTATGGAAAGGAATTTAATGAGGAATATGAACGTCTGGAGCGGCT
 106▶ SerHisLeuSerLysLeuTyrGlyLysGluPheAsnGluGluTyrGluArgLeuGluAlaAla
 379 GGTATGGGTGTGACAGCCTGCCATTTCAAGAGATGGCCTATCTTATTGTGAGAAGTGCAATA
 127▶ GlyMetGlyValAspSerLeuProIleGlnGluMetAlaTyrLeuIleValArgSerAlaIle
 442 ATGACCGGGAGTCCCTTCTTAATGTTCAAGGACCGGTGAACGTGCACTATCACTTCGATACA
 148▶ MetThrGlySerProPheLeuMetPheLysAspAlaCysAsnValHisTyrHisPheAspThr
 505 CGTGGGGATGCGCTCACAACATCAAACCTATGTACTGAAATCATTGAGAAGGCTACAGACACT
 169▶ ArgGlyAspAlaLeuThrThrSerAsnLeuCysThrGluIleIleGlnLysAlaThrAspThr
 568 AAACATGGCGTTTGTAACTTGATAAGTATAAATCTACCGCAATGTTTACGCGCATCGGCTCAT
 190▶ LysHisGlyValCysAsnLeuIleSerIleAsnLeuProGlnCysLeuArgAlaSerAlaHis
 631 GATCAGAGCTTGTATTTTCAGTATCCCATTTACTCATTGCGCAGCATATACCGCTACGATATTT
 211▶ AspGlnSerLeuTyrPheSerIleProLeuLeuIleArgAlaAlaTyrThrAlaThrIlePhe
 694 GTCAACGCAATGATGCGTGCTGGAAATTTCCCCACAGAAGCGGCCATGCGGGGTGTAGAAGAA
 232▶ ValAsnAlaMetMetArgAlaGlyAsnPheProThrGluAlaAlaMetArgGlyValGluGlu
 757 AATCGCTCTCTTGGATTGGGTATACAGGGGCTCCATACCACGTTTTTGGCCCTAGAGATGGAT
 253▶ AsnArgSerLeuGlyLeuGlyIleGlnLeuHisThrThrPheLeuAlaLeuGluMetAsp
 820 ATGGTTTCTTATGAAGCCCGTTCGCTTAAACCGCCAAATTTTAGAGAGTCTGCTCCTGGGAGCA
 274▶ MetValSerTyrGluAlaArgArgLeuAsnArgGlnIleLeuGluSerLeuLeuLeuGlyAla

HindIII

883 ATCCACGCTAGCACATCCCTATGCAAGCTTGGTATGACACCATTAAAACTTCAGAGAGAGT
 295▶ IleHisAlaSerThrSerLeuCysLysLeuGlyMetThrProPheLysAsnPheArgGluSer
 946 ATCTATGGACGTGGTTTATTACCTTTGATGCATACCCAAACACCCCCCTTATACATTTTAAA
 315▶ IleTyrGlyArgGlyLeuLeuProPheAspAlaTyrProAsnThrProLeuIleHisPheLys
 1009 AAATGGCAGCAATTGAGAGTAGTTATGATGAAATACGGACTTTACAATTCTCAATTTGTAGCA
 337▶ LysTrpGlnGlnLeuArgValValMetMetLysTyrGlyLeuTyrAsnSerGlnPheValAla
 1072 TTAATGCCAACGGTGTCTCGTCCAGGTCACTGAGAGTAGCGAGGGGTTCTCTCCAATTTT
 358▶ LeuMetProThrValSerSerSerGlnValThrGluSerSerGluGlyPheSerProIlePhe
 1135 ACTAATCTGTTTAGTAAAGTCACTAGTACCGGGGAGATCTTACGACCAAACCTACAGTTGATG
 379▶ ThrAsnLeuPheSerLysValThrSerThrGlyGluIleLeuArgProAsnLeuGlnLeuMet
 1198 CGGACGATACGACGCTATTTCCAGGGGAATGCGCGCTCTCTGTTATATCAACCTGGAA
 400▶ ArgThrIleArgArgLeuPheProArgGluCysAlaArgLeuSerValIleSerThrLeuGlu
 1261 GCTGCCCAATGGTCCATACGTGGTGCAATTCGGGGATCTCGGGGATTATCACCCCTAGCAAAA
 421▶ AlaAlaGlnTrpSerIleArgGlyAlaPheGlyAspLeuGlyAspTyrHisProLeuAlaLys
 1324 TTCAAAACCGCATTCGAATATGATCAACGACAGTTGATAGATATGTGTGCGGACAGGGCCCCC
 442▶ PheLysThrAlaPheGluTyrAspGlnArgGlnLeuIleAspMetCysAlaAspArgAlaPro
 1387 TTTGTAGATCAAAGCCACTCCATGTCTCTGTTTATCTCTGAACCGGCTGATGGCAAATTACCC
 463▶ PheValAspGlnSerGlnSerMetSerLeuPheIleSerGluProAlaAspGlyLysLeuPro
 1450 GCCTCTAGGATTATGAACCTCCTTGTACATGCATATAAATGTGGACTGAAGACCGGTATGTAT
 484▶ AlaSerArgIleMetAsnLeuLeuValHisAlaTyrLysCysGlyLeuLysThrGlyMetTyr
 1513 TATTGTAAGCTCAAAAAGGCTACCAACAGTGGTGTCTTCTCCGAGGCGAACTCATTTGTACT
 505▶ TyrCysLysLeuLysLysAlaThrAsnSerGlyValPheSerGlyGlyGluLeuIleCysThr
 1576 AGTTGCCACCTTTAAACGATTGTATATCATGTCTGCTAACGGATCTACCCCAATACCGGTCTCCACTCAA
 526▶ SerCysHisLeu...

Figura 1

1648 TACCAAAATGCCGGTATCCATAGACTCTGATTGTAGCGCCTCGCGATACTTTTACACCCTGGAA
 1 MetProValSerIleAspSerAspCysSerAlaSerArgTyrPheTyrThrLeuGlu
 1712 TGTCCAGATATAAACATGTTGCGGTCTCTCAGTATCGCGAATAGGTGGTTAGAAACCGATTTC
 20 CysProAspIleAsnMetLeuArgSerLeuSerIleAlaAsnArgTrpLeuGluThrAspLeu
 1775 CCAATCGGTGATGATATAAAGGACATTACTACACTATCCGAATCGGAGTTGGACTTTTATCGT
 41 ProIleGlyAspAspIleLysAspIleThrThrLeuSerGluSerGluLeuAspPheTyrArg
 SacII
 1838 TTTCTATTTACATTTCTATCTGCCGCGGACGATCTGOTTAACCTGAATCTCGGCAATCTATCT
 62 PheLeuPheThrPheLeuSerAlaAlaAspAspLeuValAsnLeuAsnLeuGlyAsnLeuSer
 1901 GAGCTCTTCACCCAAAAAGATATTTTACATTATTACATTGAACAGGAATGTATAGAGGTCGTC
 83 GluLeuPheThrGlnLysAspIleLeuHisTyrTyrIleGluGlnGluCysIleGluValVal
 1964 CATTCCGCTGAATATAGCGCAATACACTCCTCCTTTTAAATGTGATGCGGAGGCCGCTACG
 104 HisSerArgGluTyrSerAlaIleGlnLeuLeuLeuPheLysCysAspAlaGluAlaArgThr
 2027 GCCTATGTGGATTCTATGATTACAAAGCCGGAGCTTGGGAGGAAGGTTGAATGCGTCCGCACG
 125 AlaTyrValAspSerMetIleThrLysProGluLeuAlaArgLysValGluCysValArgThr
 2090 CGAATTGGTGAATGTGAATCCATAGCCGAGAAGGATATTCTCATGATCTTAATAGAAGGTATC
 146 ArgIleGlyGluCysGluSerIleAlaGluLysAspIleLeuMetIleLeuIleGluGlyIle
 2153 TTTTTTGTTCATCCTTCGCTGCTATAGCTTATCTGAGAACCACACATATTCATCGTAACT
 167 PhePheValAlaSerPheAlaAlaIleAlaTyrLeuArgThrHisAsnIlePheIleValThr
 2216 TGTCAAACCAACGATCTTATCAGCCGCGATGAGGCCATACATACAAACGATCCTCGTGTATC
 188 CysGlnThrAsnAspLeuIleSerArgAspGluAlaIleHisThrAsnAlaSerCysCysIle
 2279 TACAACAACCTACCTCCCGGCTCAATTAACCATCCACGGAGAGGATTCACCTCGTTATTTCTGA
 209 TyrAsnAsnTyrLeuProAlaGlnIleLysProSerThrGluArgIleHisSerLeuPheArg
 PstI
 2342 GAGGCTGTGGAACCTGAGTGTGAGTTTATCTCAACATGCGCTCCGCGCTGCGAGTAATCTACTC
 230 GluAlaValGluLeuGluCysGluPheIleSerThrCysAlaProArgCysSerAsnLeuLeu
 2405 AACGTGGCGGATATTTGTAATTATGTTCCGTATAGTCCGGACCGGTGCTCGGTATATCAAAA
 251 AsnValAlaAspIleCysAsnTyrValArgTyrSerAlaAspArgLeuLeuGlyIleIleLys
 2468 GTGGCTCCTATTTTCAACGTCCTCCGCTCCTCATCCGATTTTCCCTTAGCCTTTATGGTAAT
 272 ValAlaProIlePheAsnValProProHisProAspPheProLeuAlaPheMetValIle
 2531 GAAAAACATACCAATTTTTCGAGAGACATAGCACTACATACAGTGGCACTGTTATCAATGAT
 293 GluLysHisThrAsnPhePheGluArgHisSerThrThrTyrSerGlyThrValIleAsnAsp
 2594 CTATAACAATGCTTAATAATAAATTTAATTTAAGCTAACGTGTATCTGGATTCTCCCTTTTTTCAAAA
 314 Leu...
 2667 TAACTACACATGAGTCATTAGTAGCGTTCAACCGGTCTGTTCCCGATACATCCACTGGTTCTTTAGTTATA
 455 AsnTyr
 2739 ACGCCGTCGCGAATCACAATCATCCCAATAGGTAACCAGAACAACATAATAGTCGGGCGGGGT
 452 ArgArgArgSerAspCysAspAspTrpTyrThrValLeuValValTyrTyrAspProProThr
 2802 TGAGATATGCTTCCAGAATAAGTTAGTTATATGTTTGGCATTGGCGGCATCCCTATAAAATG
 431 SerIleHisLysTrpPheLeuAsnThrIleHisLysAlaAsnAlaAlaAspGlyIlePheHis
 2865 TTTTAGTGTTCGAACACCAGGTTAAATAGCCTTCTCTGGAGGATGGGAACCGCCTTTAA
 410 LysLeuThrGluPheValLeuAsnPheAsnAlaLysGluGlnLeuIleProValArgLysLeu
 2928 TATTGATAAGCGACCCCTTGCTCCTCCGGGGTCATTCTAGCGATAAGGTGTTTGATAAATTTCCG
 389 IleSerLeuArgGlyArgThrGluProThrMetArgAlaIleLeuHisLysIlePheLysArg
 2991 CTCGAGGACCATCATGTTTGTCTGTGGCGGGGTAAAAATGAGAGAGTCTGTGACGCGGTTT
 368 GluLeuValMetMetAsnGlnArgHisArgProTyrPheHisSerLeuArgHisArgProLys
 3054 CATTATCGGTGGGTATCGAGATGTGTATTTTAGAGTCAGACTCTGCTCTTCTATCATGGTCAG
 347 MetIleProProTyrArgSerThrTyrLysLeuThrLeuSerGlnGluGluIleMetThrLeu
 3117 CTGTTTAGACGATCCACGAATTTGAGATGGGCTGATCCTATATGTGTCTGTGGACATACATC
 326 GlnLysSerSerGlyArgIleGlnSerProSerIleArgTyrThrAspThrSerMetCysGlu
 3180 AATATCCCGTTCTTCTGACGATGAAGCATCACTGCTGGTATCCCGGCATATACTAGTAGAGGA
 305 IleAspArgGluGluSerSerSerAlaAspSerSerThrAspArgCysIleSerThrSerSer

Figura 1

3243 TTTTAGATTAAATTACCTTTTCTTTTACCTTAGTTTGTCTCTGATGTCGTTGATTAGATCGTAG
 284⁴ LysLeuAsnIleValLysGluLysValLysThrLysSerGlnHisArgGlnAsnSerArgLeu
 3306 ATTTTGTACGGATTTTAATATAGGTGCTGGTGTAGATCTGTATGACAGCGAACAAATCGCGC
 263⁴ AsnGlnValSerLysLeuIleProThrGlnHisLeuAspThrHisCysArgValPheArgAla
 EcoRI
 3369 CACGAATTCGAGTATGTCAGATTAAGCGACCGCAAGGACGTCCTTACATCGTATTGTTGGTGG
 242⁴ ValPheGluSerTyrThrLeuAsnLeuSerAlaLeuValAspArgCysArgIleThrProPro
 3432 GAAAAGTGGGAATTATATCTAATATAATATCACACCCCATTAATATAAGATCGGTATCGGTTGT
 221⁴ PheLeuProIleIleAspLeuIleIleAspCysGlyMetLeuIleLeuAspThrAspThrThr
 3495 ATAGATCTGCGCGACCGTATTGTATGATATAGATTAGCACATACATCATCAGCCTCCATATC
 200⁴ TyrIleGlnAlaValThrAsnThrHisTyrLeuAsnAlaCysValAspAspAlaGluMetAsp
 3558 ACTGACATTTACATATGGGTACCCTAGATAGCGGATGAGGTTTACACATAATCTATAACATAA
 179⁴ SerValAsnValTyrProTyrGlyLeuTyrArgIleLeuAsnValCysLeuArgTyrCysLeu
 3621 ACGTGGGGTATAAGCTAATGAACCTCCATCTCGCTGATATACGTTCTTGGATATCTACTTTGCA
 158⁴ ArgProThrTyrAlaLeuSerSerTrpArgAlaSerIleArgGluGlnIleAspValLysCys
 3684 ATCTTTCCGGTTTCCACCATCTGGTTCCGAAGTATCTTCACACGGCCCTCCATGTGGAATGGA
 137⁴ AspLysProAsnGlyGlyAspProGluSerThrAspGluCysProGlyGlyHisProIleSer
 3747 AAATTCCCCCAAGCGTCCAGATCCACCCTGTAACACATCGTCTGTGTCACTATAGCCTTGGC
 116⁴ PheGluGlyLeuArgGlySerGlyGlyGlnLeuCysMetThrGlnThrValIleAlaLysAla
 3818 TCCATATTTTACCTGTCCATCACCATAGATACCTCTATCCGAAACGAAGATCGGAAAGTATGA
 95⁴ GlyTyrLysValGlnGlyAspGlyTyrIleGlyArgAspSerValPheIleProPheTyrSer
 3873 TCGCTTCTGTAAACAGTTTAAAGAAGCGAAAAGAAACACTCGGCAGTCACCGTTGCATTATCACT
 74⁴ ArgLysGlnLeuLeuLysLeuLeuSerPhePheCysGluAlaThrValThrAlaAsnAspSer
 3936 TGTATATCTTTCTCTGGAAGAATTTCTCCCATAAAGTGTGTACATAACATTCCATAAATCTAT
 53⁴ ThrTyrArgGluArgSerLeuIleGluGlyMetLeuThrTyrMetValAsnTrpLeuAspIle
 3999 AGCGATGGGTGTATAAATACCAGGTGGTGTAGTGATGGCATCATGTTTTACCAAACGGTTGCA
 32⁴ AlaIleProThrTyrIleGlyProProThrThrIleAlaAspHisLysValLeuArgAsnCys
 4062 GTAGGCGTATTTTAAACATCCCAAATAAGCCCATCTCTGACACTATTGATTATATCTCGTTTCTAGAGCA
 11⁴ TyrAlaTyrLysLeuMetGlyPheLeuGlyMet
 4131 GAGTCGTATTAAATGCGAGGTAAACAATCGCTCCGGTGAAGGCAGTTCCCAACTAGATTAAACCCCTAGTTGA
 4205 TTATGGACATTATAATGCCCTGGGTGGCGGAATCATCGCCGACCCCAACTCAAAGCACGACCAATATGAGCGG
 4279 CTCGTGGAACCTCAAATCCTATTTGGTGATCATGAACAATAAAATGAAACCAAATACATGGTAGATAATTA
 4353 ATCCCTCTCCCCACTCTGGCGTCATAGCGCGGCGGTGAAGCCTATAAAGAATACAGGTCCGAGGAAATTTGTCTT
 4427 ACTTTTCCCTTTGTGAGTTTAAATTTGTGTGTAAACTAGCTCTCTACGATGGCATTTCACCGTCGAGA
 1⁴ MetAlaPheProProSerArg
 4497 TTAGAGGTTGGAATAAATAAAGCTATTAAACCATCCGGCACAAGTTGTCCACGCGGGACCTCTT
 8⁴ LeuGluValGlyIleAsnLysAlaIleAsnHisProAlaGlnValValHisAlaGlyProLeu
 4560 CCGGGTGGTGTGAATCTAACACTATCTTCGGAAACGCTGTCTCGAAGAAGACAAGCTACGC
 29⁴ ProGlyGlyValGluSerAsnThrIlePheGlyAsnAlaValLeuGluGluAspLysLeuArg
 4623 GAGGTAATGACCATATTGACACCGATATCGACCACTCTTAAAACTCATTTTGGTTTTFAGT
 50⁴ GluValMetThrIleLeuThrProIleSerThrSerLeuLysAsnSerPheLeuValPheSer
 4686 GCCGATGGGATGTTGATTCATACGAGTGTATGTCACGAACAGATATATATACCAATATCAAAG
 71⁴ AlaAspGlyMetLeuIleHisThrSerValCysHisGluGlnIleTyrIleProIleSerLys
 4749 AATCAGTTTTTCATCATATAGATGGACATATGGACAGCCTGCGGTATTTTACGGAATATGCAC
 92⁴ AsnGlnPheSerSerTyrArgTrpThrTyrGlyGlnProAlaValPheLeuAlaAsnMetHis
 4812 GGACGTCGTAGCTTGTGGACGTATTTAAAACTACTGGGAGAAAAAGTGCAACCAAGAAGGTA
 113⁴ GlyArgArgSerLeuLeuAspValPheLysThrThrGlyArgLysSerAlaThrLysLysVal
 4875 ATTTTCGAGATAACTAATGTTTCATCCGGGTAGAATGTTAAACCAAGTAGTTTTTAACTTAGAC
 134⁴ IlePheGluIleThrAsnValHisProGlyArgMetLeuAsnGlnValValPheAsnLeuAsp
 4938 CTCGATGGTGGACTATCTTCTTCAAACTTATAAAATCAGAATTTAATAATTATTGTGTTATG
 155⁴ LeuAspGlyGlyLeuSerSerSerGlnLeuIleLysSerGluPheAsnAsnTyrCysValMet
 5001 TTACCCACGAGAGTACCCGATTTGACGCTTGAGTTTTCAAAACCTCAACTAAACAAAATATTG
 176⁴ LeuProThrArgValProAspLeuThrLeuGluPheSerLysProGlnLeuAsnLysIleLeu

Figura 1

SspI

5064 GACCTTGGAAAACGCATAAAATCTACACTAGTGTGTTGAATCTACGGTGAGAGAAACCATCAAT
 197 AspLeuGlyLysArgIleLysSerThrLeuValPheGluSerThrValArgGluThrIleAsn
 5127 ATTATATCCGACGTCGGGAGAGTAACATTTACCACGACTCATGAATCGGCTGATGAAAATCAA
 218 IleIleSerAspValGlyArgValThrPheThrThrThrHisGluSerAlaAspGlyAsnGln
 5190 GATAGCCGCTGTATTTTACGCAGTCTCCCAAGGTCCCACATACTTGGTAATGTATCATCAACC
 239 AspSerArgCysIleLeuArgSerLeuProArgSerHisIleLeuGlyAsnValSerSerThr
 5253 GTTAATTTCTCTGGGGTTTTGAACCCCTTCCGCCTAGCTTTGGAATCCCCCGTAAACTTTTTT
 260 ValAsnPheSerGlyValLeuLysProPheArgLeuAlaLeuGluSerProValAsnPhePhe
 5316 CAACTTCTTCGTAAATTGAAACTTACACATACCGACGTCAGCCTCAATTTCTTCTCACTCCA
 281 GlnLeuLeuArgLysLeuLysLeuThrHisThrAspValSerLeuAsnPhePhePheThrPro
 5379 AGTACTACACCCATGTTAAGTCTGACTACCAGAAAACCCGTTGGTGTAATGATGTTTTCTTC
 302 SerThrThrProMetLeuSerLeuThrThrArgLysProValGlyValMetMetPhePhePhe
 5442 TGTACCACGGAATGCTAGGATCATCCGAGTCAATTAACCGGGGATATGGATGATCCCTCG
 323 CysThrThrGluCysLeuGlySerSerGluSerIleLysThrGlyAspMetAspAspProSer
 5505 ACAACCGAGGAGGAAAGTATCCCCAGGTTAAAGCGCGGAGTGTTAGAAGAGTTCCGTGATTCT
 344 ThrThrGluGluGluSerIleProArgLeuLysArgArgValLeuGluGluPheArgAspSer
 5568 GAAGGACCCAGTAAAAAAGCTTTGTACTTTTGTGTTTACTCATCTCCACTATGCAACCCGAATCCT
 365 GluGlyProSerLysLysLeuCysThrPheValTyrSerSerProLeuCysAsnProAsnPro
 5631 GGTACACGGGGAGAAAACCCATCTGATATTTAGATGTAATAGCCAAATACCACAGATCGTTCGCTGTA
 386 GlyThrArgGlyGluAsnProSerAspIle...
 5700 TACTTGATCCCATTTATGTTAAATAAAGTATTTTTAATGTAATATATGTGTAGTTTCGTTTATTCATAAAG
 5774 CTAGTTAGATATCTCCACCCACATTTTCTGGTATTTGTAATAAAAAATTGAGCCAGGCGAAAGAAAGTCAGTAA

SacI

5848 GTGCCAGCCAGACTTCGGGTATGGCCACCCGATGACTGTACGTCTCCAACATAATGCAGCTGGGAGC
 1 MetAlaThrAspAspCysThrSerProThrAsnAlaAlaGlySer
 5914 TCAACAACCAACAATAACGGTCTCGCTCCAGAGGGATATCGGATATAACACTACCCCTCATTT
 16 SerThrThrAsnAsnAsnGlyLeuAlaProGluGlyIleSerAspIleThrLeuProSerPhe
 5977 ACTGTGAGGAAGTCTCGGGATCGAGGACTGGATGTATCGCATGTGTGTACACGGCAACTAAA
 37 ThrValArgAsnCysSerGlySerArgThrGlyCysIleAlaCysValTyrThrAlaThrLys
 6040 GCGTTATGTTATATAGGGGTCCAATCTGGAATTTTAACAGCATCGATCGCTCTCATTTGGCTC
 58 AlaLeuCysTyrIleGlyValGlnSerGlyIleLeuThrAlaSerIleAlaLeuIleTrpLeu
 6103 CTAACACGTACAACAACATATGCAGCCGGAATCCTPATATTTATAAGTCTAATATCCACAATG
 79 LeuThrArgThrThrThrTyrAlaAlaGlyIleLeuIlePheIleSerLeuIleSerThrMet
 6166 AGGCTCTCTATGGTAAAAACTGAACGTATCACAACATATATGCCGCTTTACTCAGACCCCTCTGT
 100 ArgLeuSerMetValLysThrGluArgIleThrThrIleCysArgPheThrGlnThrLeuCys
 6229 GTGGCCATAGCGGCAGTTGGATGGCGGTGTGATGATTTGTTACAACCAAGTTGGATTTACCCCT
 121 ValAlaIleAlaAlaValGlyTrpAlaCysAspAspLeuLeuGlnProValGlyPheThrPro
 6292 CTCTACTCCTATGTCTAGCAGGAATCGCTGTATGTGCTGCGATCATACATGTGTTTTACTTC
 142 LeuLeuLeuLeuCysLeuAlaGlyIleAlaValCysAlaAlaIleIleHisValPheTyrPhe
 6355 ATCTGCACAGCCAATGGATCGGGAACACATTTTCGTATGGCCATCGTTACCATGACCCCTCGGT
 163 IleCysThrAlaAsnGlySerGlyThrHisPheArgMetAlaIleValThrMetThrLeuGly
 6418 GCGCTGTTGGGAGTATCGAGTATCGCCGTGACTGTGAAATCTGAAATTTCTATCGGCCCTCGGT
 184 AlaLeuLeuGlyValSerSerIleAlaValThrValLysSerGluIleLeuIleGlyLeuGly
 6481 ATTGCATGCTCGATTATGTCTCCAGCGAGACTTTGGAATGATACTTAGAGACACATGTCAT
 205 IleAlaCysSerIleIleValSerGlnArgAspPheGlyMetIleLeuArgAspThrCysHis
 6544 TACAGATTAGGTCGTTATTCGTTAATGCGCACTTTTACGGATTTGGGGCGTGGTGCTAACCAT
 226 TyrArgLeuGlyArgTyrSerLeuMetArgThrPheThrAspLeuGlyArgGlyAlaAsnHis

SalI

5607 AATCCAGTCGACTTTATCGTACCCAACATCGAGGATGTCTACGAGGACAAGATTAGCAGCGTT
 247 AsnProValAspPheIleValProAsnIleGluAspValTyrGluAspLysIleSerSerVal
 6670 AAAATTTTTCGAGAACACCCCACTTTGATTATGGCCCCGTTGATAGGCTAACCCTCACCCCT
 268 LysIlePheArgGluHisProThrLeuIleMetAlaProLeuIleGlyLeuThrLeuThrPro

Figura 1

6733 CCGATATGGGGTTATTGTGCACATCACTAAATATGGCCATGATTTTCAGACGCCCTTAACAGTT
 289 ProIleTrpGlyTyrCysHisIleThrLysTyrGlyHisAspPheGlnThrProLeuThrVal
 6796 GTGATTTGTGTTATCGTTGGACATTGTTTGGCATTGCTGGAACCTTTGATGGTCTACCGA
 310 ValIleCysValIleValGlyHisCysLeuAlaPheCysLeuGluProLeuMetValTyrArg
 6859 AGAATGTATATACCTGAGGTCCTCGTGAGTTTCCATGGCATGGCTGAAATAACCGGGATAGTC
 331 ArgMetTyrIleProGluValLeuValSerPheHisGlyMetAlaGluIleThrGlyIleVal
 6922 TTGGCACTGCTTGGTGTAAATTTTGGCACGCCCTGGTGTGACTCTGGCTATATCTGAGACT
 352 LeuAlaLeuLeuGlyValAsnPheGlyThrProLeuValLeuThrLeuAlaIleSerGluThr
 6985 CTAACCTGCTTACTCCATCTACGAAAAATCATCCTCGGCGGAAACCGCTGGCTGCTACCTAC
 373 LeuThrCysLeuLeuHisLeuArgLysIleIleLeuGlyAlaLysArgLeuAlaAlaThrTyr
 7048 CTATGCAGGGGTCTACACACGGGCATGTATGTTACTGCTGGAATGTGTTATTTGTACAGTCAT
 394 LeuCysArgGlyLeuHisThrGlyMetTyrValThrAlaGlyMetCysTyrLeuTyrSerHis
 7111 ATGTAATGTACCACTCAACACGATATATTATATCGCGGTGTGTCTAATAACTGTTTTAAATAAGAGATA
 415 Met...
 7184 AGTCGAAATCACAGGCAGTGAAATGCCCTAAAAATGGGTCTCCTGTCTATGTTAGGAATCTCTTATTTTAAAGTA
 SmaI
 7258 GTCCCGCGAGACGATTACATCCCGGATCACCACAATCTGCGATGAGACGATATAGGATGGGACCGCGAATC
 Sall
 7332 TACCTTCTCTATATCTGTCTGTTATATACATATCTCCAGTTTGGTACTTCGTCGACAACCGCGGTCACTATGTA
 7406 AATAGTGATAATAGTACTCGGAGATGTTATCATCTACCAGCATGTCCGCTACCACCCCGATATCCCGAG
 I MetSerAlaThrThrProIleSerGln
 7476 CCAACATCTCCATTCACTACTCCAACCTAGAAGATCTACAAATATAGCTACAAGTTCCGAGTACC
 10 ProThrSerProPheThrThrProThrArgArgSerThrAsnIleAlaThrSerSerSerThr
 7539 ACCCAGGCATCCAGCCAACATCTACATTAACTACTCTAACTAGAAGCTCGACCAACTATAGCT
 31 ThrGlnAlaSerGlnProThrSerThrLeuThrThrLeuThrArgSerSerThrThrIleAla
 7602 ACAAGTCCGAGTACCACCCAGGCAGCCACATTCATAGGATCATCTACCGATTCCAATACCACT
 52 ThrSerProSerThrThrGlnAlaAlaThrPheIleGlySerSerThrAspSerAsnThrThr
 7665 TTAACAACAAACAAAAAACCAGCGTAAAAAGAATAAGAATAACGGGGCCAGATTTTAAA
 73 LeuLeuLysThrThrLysLysProLysArgLysLysAsnLysAsnAsnGlyAlaArgPheLys
 7728 TTAGATTGTGGATATAAGGGGGTTATCTACAGACCGTATTTTAGCCCTCTTCAGCTAAACTGT
 94 LeuAspCysGlyTyrLysGlyValIleTyrArgProTyrPheSerProLeuGlnLeuAsnCys
 7791 ACTCTACCCACAGAACCTCATATTACCAACCCATTGACTTCGAGATCTGGTTTAAACACGC
 115 ThrLeuProThrGluProHisIleThrAsnProIleAspPheGluIleTrpPheLysProArg
 7854 ACCAGATTGGGGATTTTCTTGGGGATAAAGAAGACTTCGTAGGGAATCATACCCGACACGC
 136 ThrArgPheGlyAspPheLeuGlyAspLysGluAspPheValGlyAsnHisThrArgThrSer
 7917 ATATTACTATTTAGCAGCCGTAATGGGAGTGTTAATTCATGGATCTTGGGGACCGGACACTC
 157 IleLeuLeuPheSerSerArgAsnGlySerValAsnSerMetAspLeuGlyAspAlaThrLeu
 7980 GGGATCCTACAATCTAGGATACCAATTACACATTATATAATATTTCCATACAACATACCGAA
 178 GlyIleLeuGlnSerArgIleProAspTyrThrLeuTyrAsnIleProIleGlnHisThrGlu
 8043 GCGATGTCAATTGGGAATCAAATCTGTGGAATCTGCCACGTCCGGTGTATATACATGGCGGGTC
 199 AlaMetSerLeuGlyIleLysSerValGluSerAlaThrSerGlyValTyrThrTrpArgVal
 8106 TATGGTGGAGATGGACTAAATAAAACAGTGCTAGGACAGGTAATGTATCTGTAGTGGCATAT
 220 TyrGlyGlyAspGlyLeuAsnLysThrValLeuGlyGlnValAsnValSerValValAlaTyr
 8169 CACCCCCGAGCGTAAATCTTACACCACGCGCCAGTCTATTTAATAAGACCTTTGAGGCGGTA
 241 HisProProSerValAsnLeuThrProArgAlaSerLeuPheAsnLysThrPheGluAlaVal
 8232 TGTGCAGTGGCGAATTACTTCCCGGATCCACGAACTAACATGGTATCTTGACGGGAAGCCA
 262 CysAlaValAlaAsnTyrPheProArgSerThrLysLeuThrTrpTyrLeuAspGlyLysPro
 8295 ATAGAAAGCAATACATTTCAGATACGGCAAGTGATGGATAGATGGACTCATCACCAGAAGT
 283 IleGluArgGlnTyrIleSerAspThrAlaSerValTrpIleAspGlyLeuIleThrArgSer
 8358 TCTGTGTTGGCTATTCCGACAACAGAAACAGATTCGAGAAACCAGATATACGATGTGATTTG
 304 SerValLeuAlaIleProThrThrGluThrAspSerGluLysProAspIleArgCysAspLeu
 8421 GAATGGCATGAAAGTCTGTGTCCTATAAGAGATTACAGAAAGTGATAGCCCCGGACGCTCTAT
 325 GluTrpHisGluSerProValSerTyrLysArgPheThrLysSerValAlaProAspValTyr
 8484 TACCCACCTACTGTGTCTGTACCTTCGCTGATACACGGGCTATATGTGATGTTAAATGTGTA
 346 TyrProProThrValSerValThrPheAlaAspThrArgAlaIleCysAspValLysCysVal

Figura 1

8547 CCACGGGACGGGATATCCTTGATGTGGAAAATTGGTAACTACCATCTACCARAAGCAATGAGT
 367 ProArgAspGlyIleSerLeuMetTrpLysIleGlyAsnTyrHisLeuProLysAlaMetSer
 8610 GCTGATATACTGATCAGAGTCCGTGTATAGAACGTCAGGTTTGGTCAACATTTCAGAGTATG
 388 AlaAspIleLeuIleThrGlyProCysIleGluArgProGlyLeuValAsnIleGlnSerMet
 8673 TGTGATATATCAGAAACGGATGGACCCGTGAGTTATACCTGTCAGACCATCGGATACCCACCA
 409 CysAspIleSerGluThrAspGlyProValSerTyrThrCysGlnThrIleGlyTyrProPro
 8736 ATTCACCGGGATTTCACGACACACAAGTCTACGACGCGTCCCTGAAATCGTCAGTGAATCA
 430 IleLeuProGlyPheTyrAspThrGlnValTyrAspAlaSerProGluIleValSerGluSer
 8799 ATGTTGGTTAGTGTCTGCTGTAATACTAGGAGCTGTTCTCATCACAGTCTTTATCTTTATT
 451 MetLeuValSerValValAlaValIleLeuGlyAlaValLeuIleThrValPheIlePheIle
 8862 ACGGCATTATGTTTATATTATTCTCATCCCCGGCGATTATAACTCTTATAGTTCGTATAAATTACTT
 472 ThrAlaLeuCysLeuTyrTyrSerHisProArgArgLeu...
 8929 ATCATAACCGTGTTCAGCGTTATATTTTATAACAGTTAATTGTTTACTAATAGTTTACAAAGTCCATCGTT
 9003 TATAAAAAACAAGCCCACTGGTATTATATCATTCGTATGGATATAAACCGACTCCAATCCGTGATCTTTGGTA
 SpeI
 9077 ACCCGCGACGTAATTACTCTCACACATTTTAACTAGTCTACGATCACCAGATATAATAAAAGATTCCGGTGG
 9151 ACATGCAAGGTATGAGGTCTACGTCACAGCCGTTGGTTCGAGATACCACTGGTAGATATGGAACC
 1 MetGlnGlyMetArgSerThrSerGlnProLeuValGluIleProLeuValAspMetGluPr
 9215 ACAGCCATCTATACACTCCAACGAGCCTAACCCACCGAATAAAATGTTGACGACAGCTATTTTC
 21 cGlnProSerIleHisSerAsnGluProAsnProProAsnLysMetLeuThrThrAlaIleSe
 9278 ATCGCGTAGGAGTGGAAATTTTTTATTTCTCTGGGTATGTTTTTTTCGGAGTTATCTTAAC
 42 rSerArgArgSerGlyIlePheLeuPheSerLeuGlyMetPhePhePheGlyValIleLeuTh
 9341 AGCTACTATTATAGTATGTACATTCATATTTACAATACCAGTGGATATGCTCCAGATGCCACG
 63 rAlaThrIleIleValCysThrPheIlePheThrIleProValAspMetLeuGlnMetProAr
 9404 CTGCCCTGAGGAAACGGTGGGTATCAAAAACGTTGTATCCGACCGATTAGACGCCATGTTAA
 84 gcysProGluGluThrValGlyIleLysAsnCysCysIleArgProIleArgArgHisValLy
 9467 ATCACACCAAGATCTAGTTGCCACATGTGCCGAATACATGGAACAACCCGCCACCGCATCTGC
 105 sserHisGlnAspLeuValAlaThrCysAlaGluTyrMetGluGlnProAlaThrAlaSerAl
 9530 TGTGGAGCGCTTATACCATTTATGGACATCTTCAATGGAGATGGGATATCTACAAACGACTC
 126 aValGlyAlaLeuIleProLeuLeuAspIlePheAsnGlyAspGlyIleSerThrAsnAspSe
 9593 TCTTTACGATTGTATTCTCTCTGATGAAAAAATCGTGTAAATACATCAATGGCCGTATGTCA
 147 rLeuTyrAspCysIleLeuSerAspGluLysLysSerCysAsnThrSerMetAlaValCysGl
 9656 ATCAACATATCTTCCAAATCCCCTAAGTGACTTTATTTATGCGCGTTAGGCAGATATTTCTCGG
 168 nSerThrTyrLeuProAsnProLeuSerAspPheIleMetArgValArgGlnIlePheSerGl
 9719 AATCCTAAATCATTATCCATTTACTAAATAAATAACAAATACCGTTTAGSTAATTAACATGATTCTAGT
 189 yIleLeuAsnHis...
 9790 GTTTATTGTCGTATGTACGGGCGATGGGTGGATAACAACTCGACAATGATCAATTATATTGATTAACTTGTAA
 9864 TAAATTCGTCGGATTATTTGGATATATCGAGATGATATCATTATTTTCTAATAGCGTGTGTTTGAAG
 299 LysArgIleAlaHisThrGlnPheA
 SpeI
 9933 TCCACCCTACTAGTGCCATGTGCGCGTTTGATCGAAGAGGCATTTAATGTTGCCAGAGTTTCA
 289 spValArgSerThrGlyHisAlaArgLysIleSerSerAlaAsnLeuThrAlaLeuThrGluI
 9996 ATTCCGTATGTATCGTCGAGTAATCTAGACCGTGGGCGAAATCTTTCTACTACTTCTTCAATC
 268 lGlyTyrThrAspAspLeuLeuArgSerArgProArgPheArgGluValValGluGluIleG
 10059 CCAGGCGAGGATGATCGTCTGCGTGGGAGGTTTTTCTTTACATCACCACATTCGTTATATAAT
 247 lProSerSerSerArgArgArgProLeuAsnLysLysValAspGlyCysGluAsnTyrLeuG
 SmaI
 10122 TCGGGATAATCACCTTTAGGTCCCCCGGGCTTGAACATTGACACTTTTTATGACAAATCGGT
 226 luProTyrAspGlyLysProGlyGlyProLysSerCysGlnCysLysLysHisCysIleProT
 10185 GTCTGGTAATGCTCCGTATATTGGAGCTGTGAGGTAGTTCCAGACGCGGACGATCTCTGGAC
 205 hrGlnTyrHisGluThrTyrGlnLeuGlnSerThrThrGlySerAlaSerSerGlyArgSerG
 XhoI
 10248 TCGCGCGTATCTTCAGGGGAAATACAACGAGGCTGTGGTAATGAGTCTGGTATGCATCTCGA
 184 lnAlaThrAspGluProSerIleCysArgProHisGlnTyrHisThrGlnTyrAlaAspArgP

Figura 1

```
10311 GGTTCATCTCCATTACTGAGATTCGAGGAATTAAGTTTCAGTGAGACCGTAGGACGGATTA
1634 roGluAspGlyAsnSerLeuAsnSerSerAsnPheThrGluThrLeuGlyTyrSerProAsnA
10374 TTAATATGATCTTCGACTCTTCGGGTCGGATGTCATCTAAACTGGTATAGGGTGTCCGTCA
1424 snIleHisAspGluSerGluGluProArgIleAspAspLeuSerThrTyrProThrGlyAspC
10437 CAGTCCGAGGAATCAAAACGATCATCGAGTTGTTTTGTGCGCGCATCCGATCTCAAGGGCGTT
1214 ysAspSerSerAspPheArgAspAspLeuGlnLysThrArgAlaAspSerArgLeuProThrA
10500 CTATGGAAGCACCCCTCTACCCCGTCTGGGGTATTAGAAGGGTGGTCTCCAAGACCTGGGGAG
1004 rgHisPheCysGlyGluValGlyAspProThrAsnSerProHisAspGlyLeuGlyProSerS
10563 GATATATCCCGAGGGGTTAGTGGGGAGGCTAAGAGTGATGCCATACCCATATATGGGTTTGGG
794 exIleAspArgProThrLeuProSerAlaLeuLeuSerAlaMetGlyMetTyrProAsnProP
10626 GGGGTGATGACAGCTGGTGGGTAGGTAACATCATGATGAGCGTGTCGAGTGGGTGGGGATGGT
584 roThrIleValAlaProProTyrThrValAspHisHisAlaHisProThrProProSerProL
10689 AGTGGGAGGCTCTGCCGATCTATGTGTGTCATCATCTGTGATACACACCGCCTCTCAGTTTTC
374 euProLeuSerGlnArgAspIleHisThrMetMetGlnSerValCysArgArgGluThrLysA
EcoRI
10752 GCCCTCTCCCGGGTGGATCTCCGTCTTCCACGTTCTATCGAACCAAGAATTC
164 laArgGluArgThrSerArgArgArgGlyArgGluIleSerGlyLeuIle
```

Figura 1 (final)

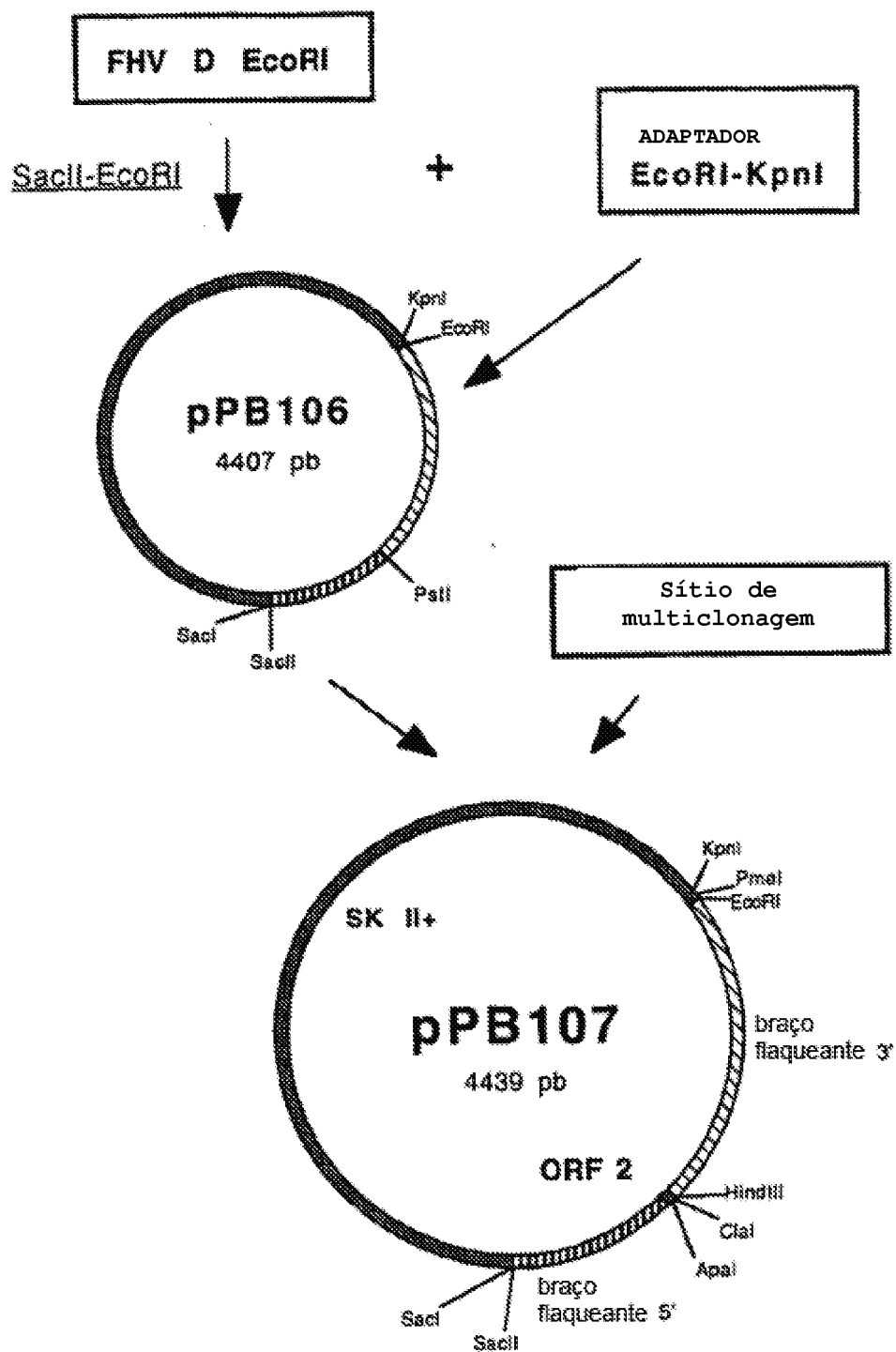


Figura 2

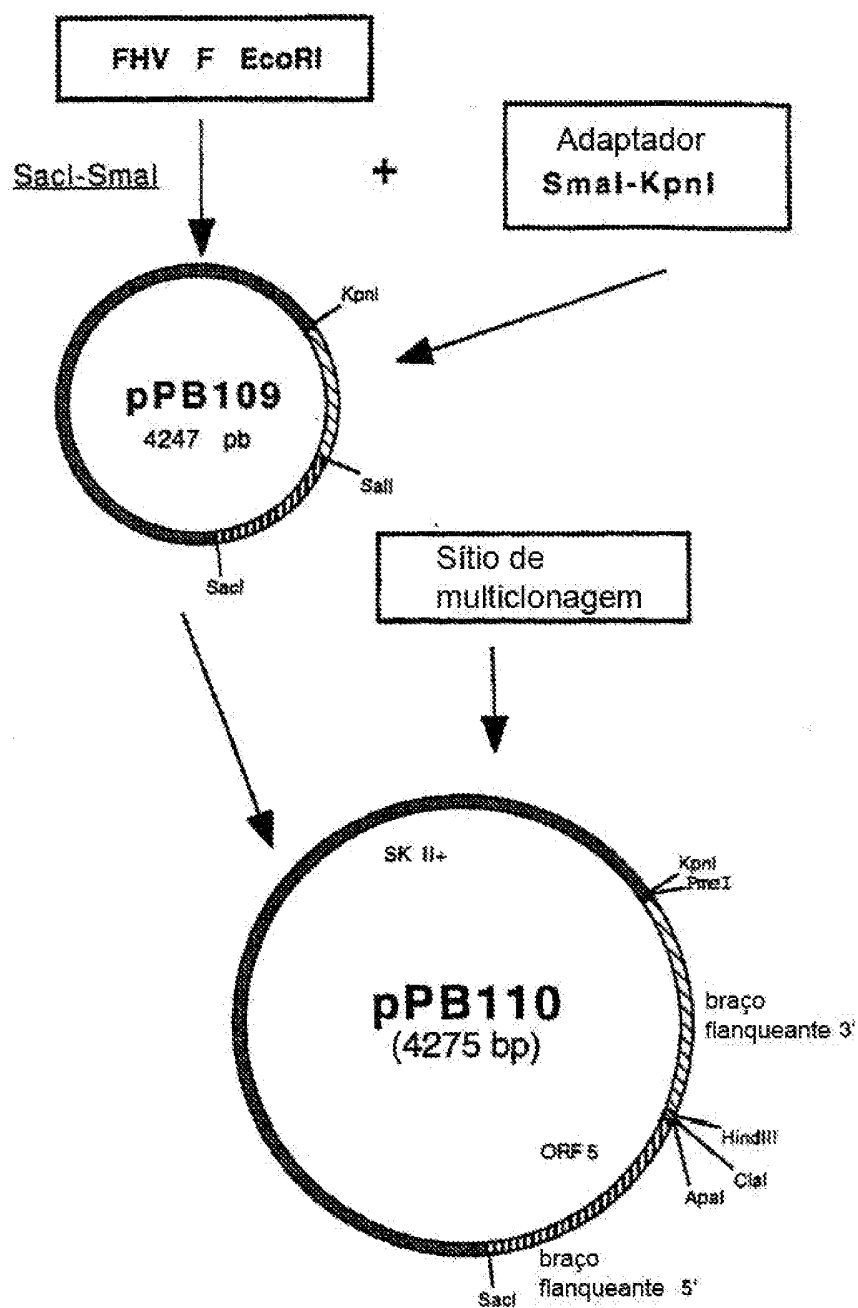
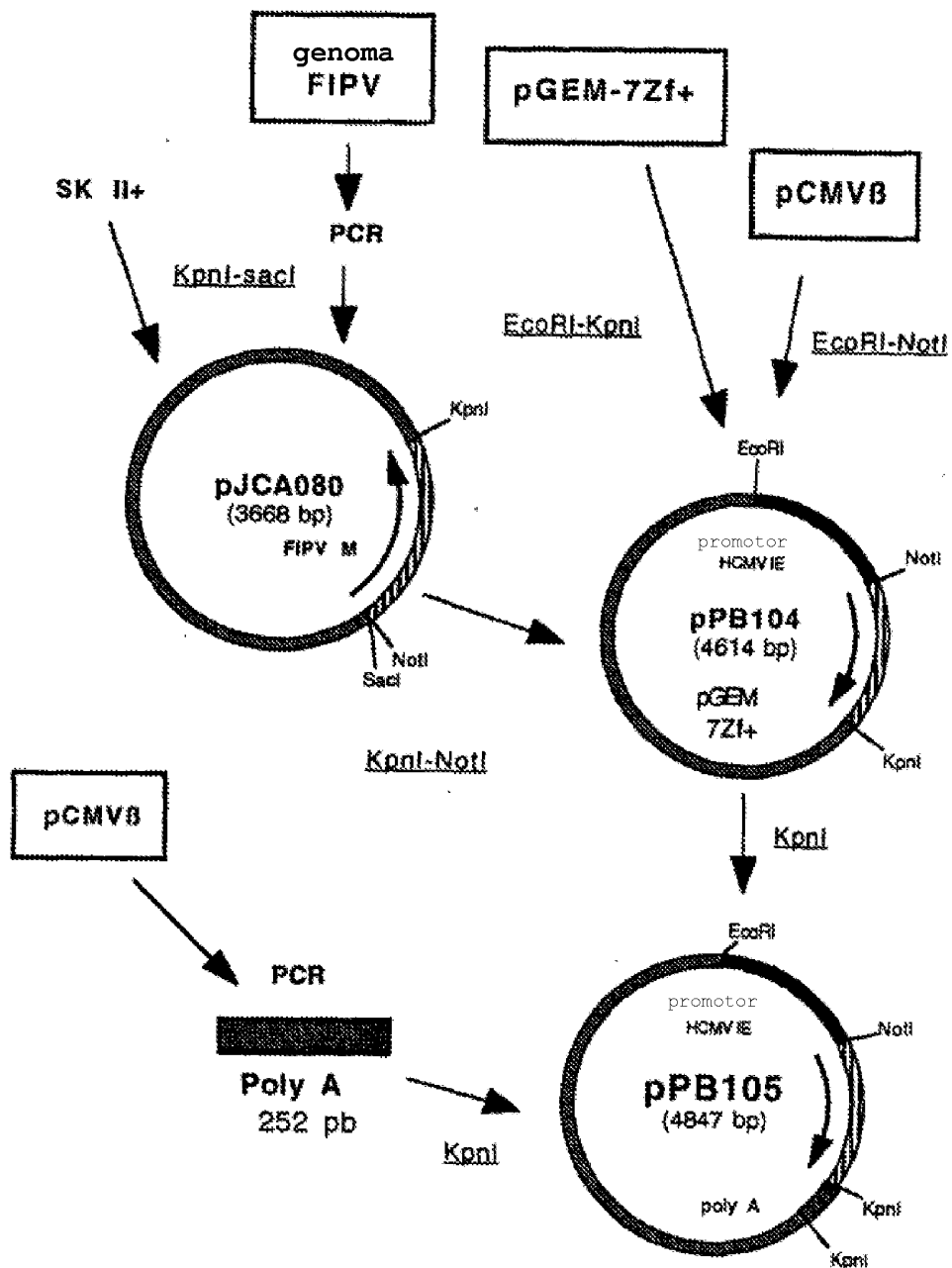


Figura 3



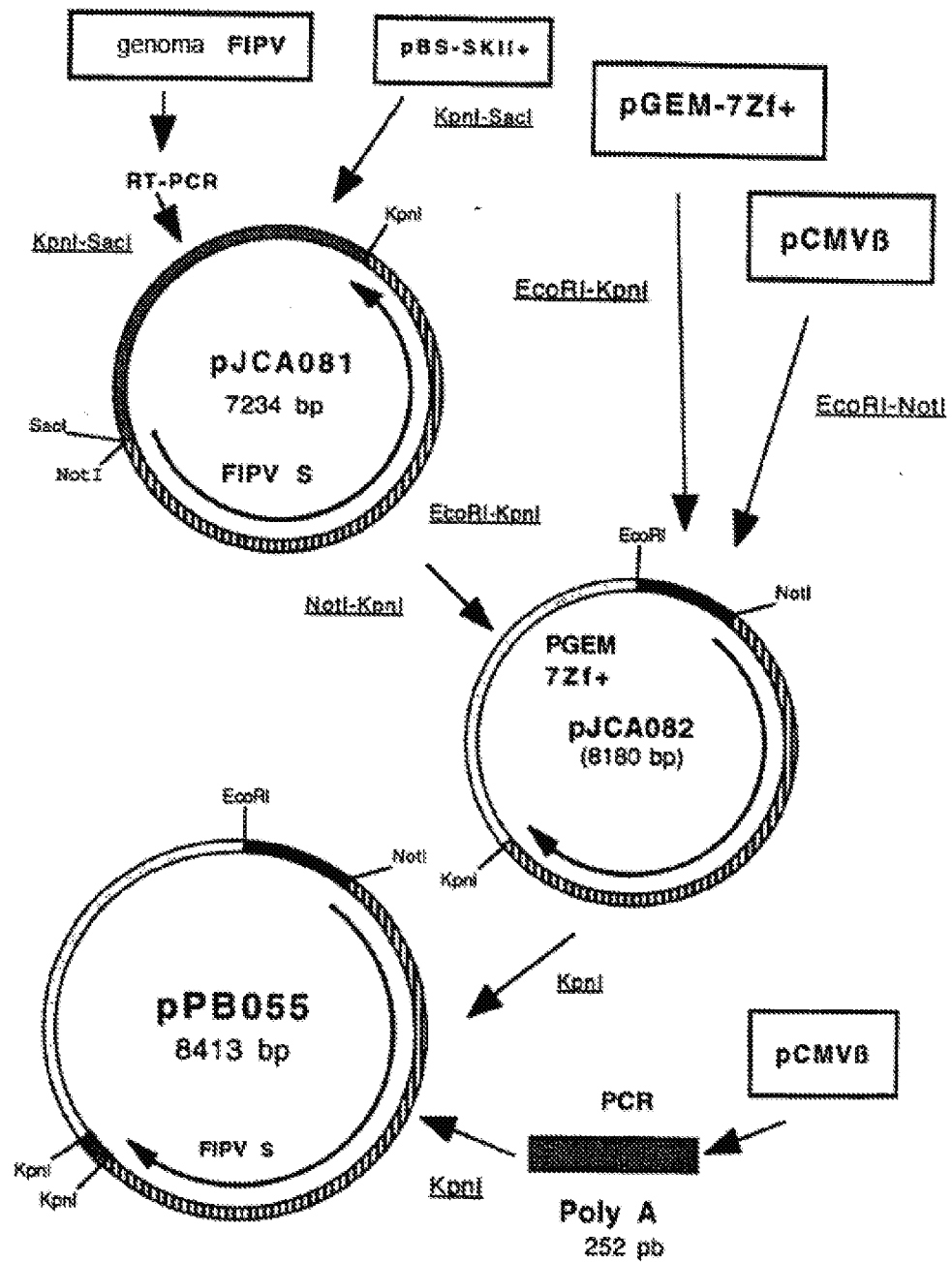


Figura 5

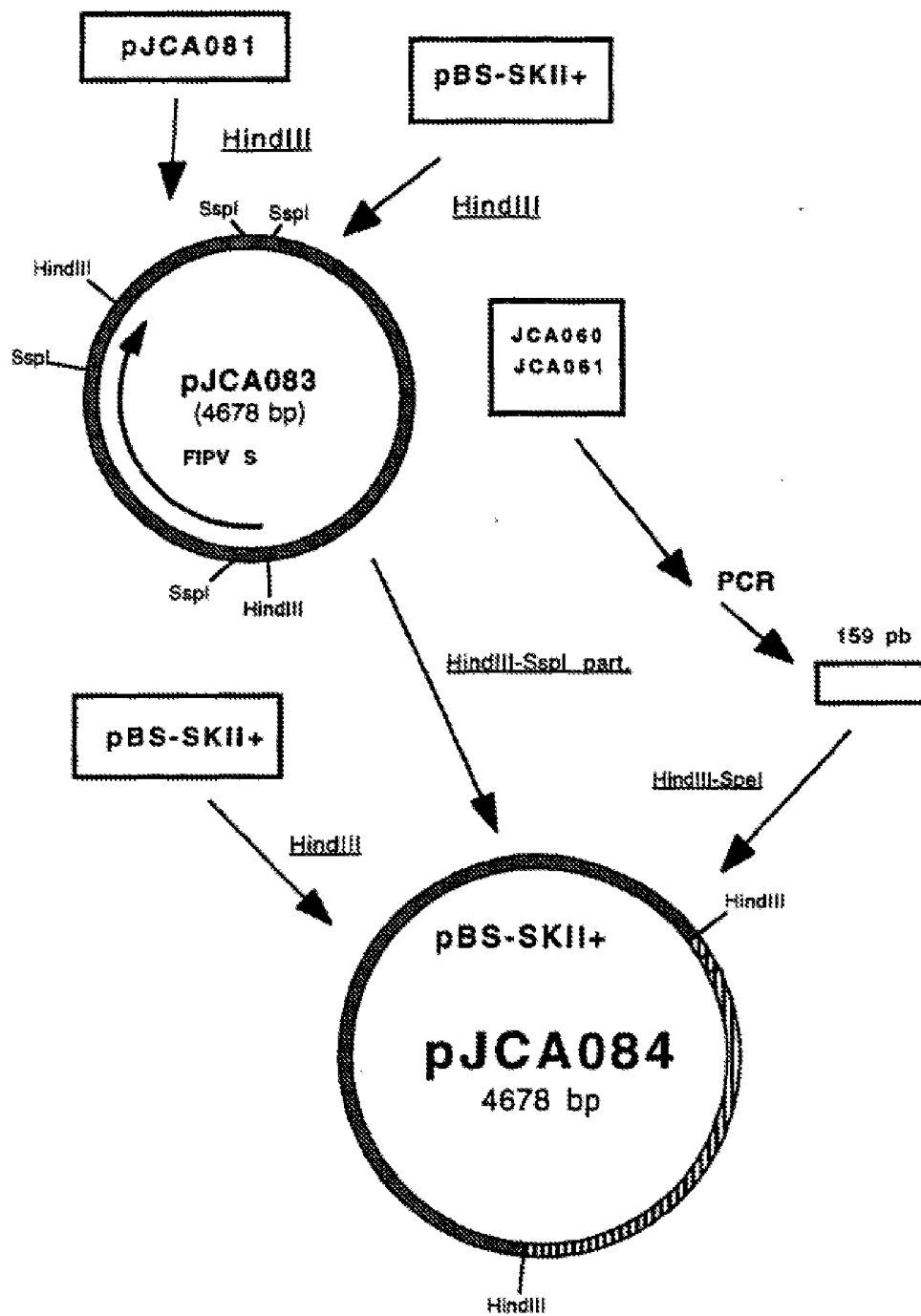


Figura 6

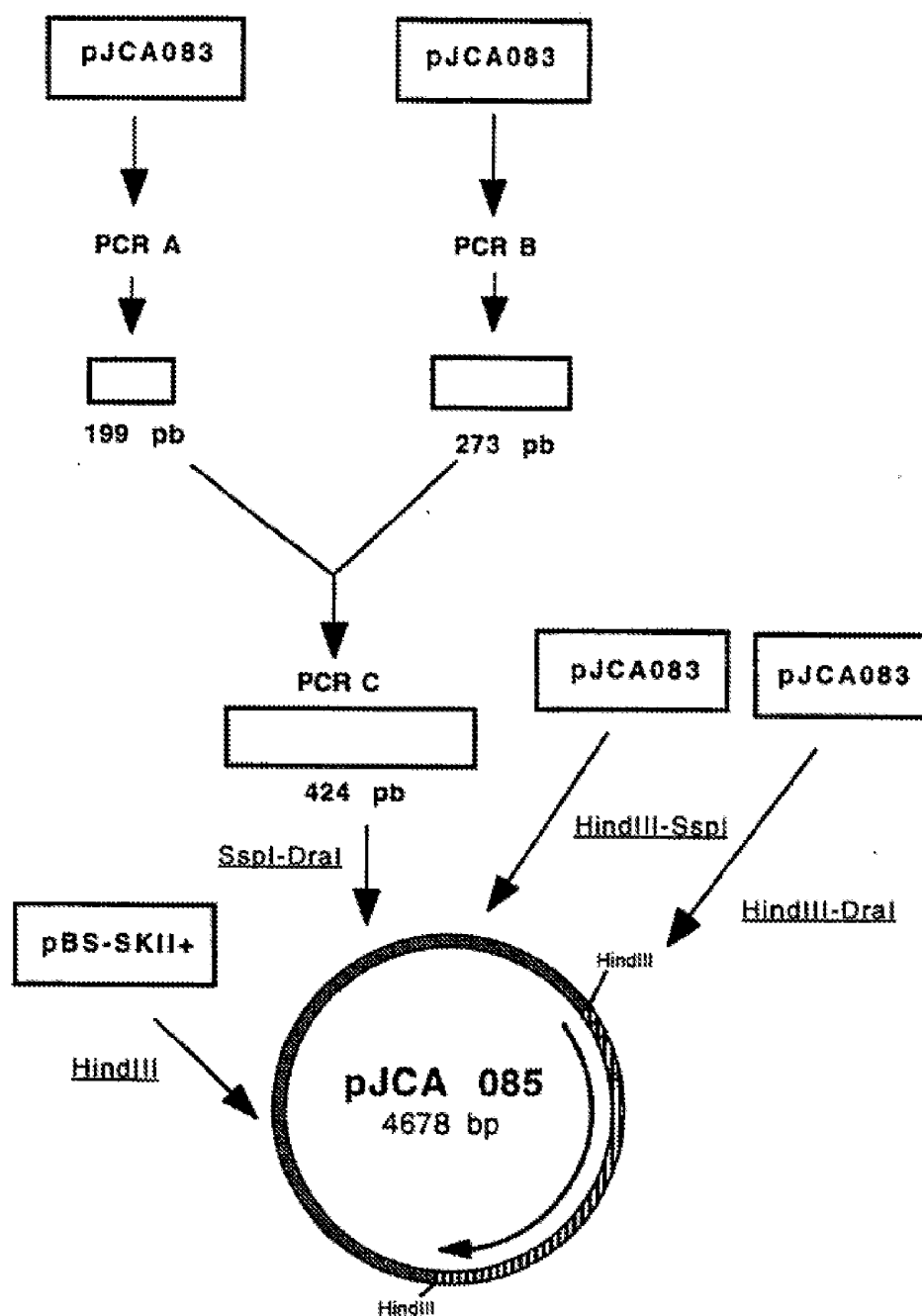


Figura 7

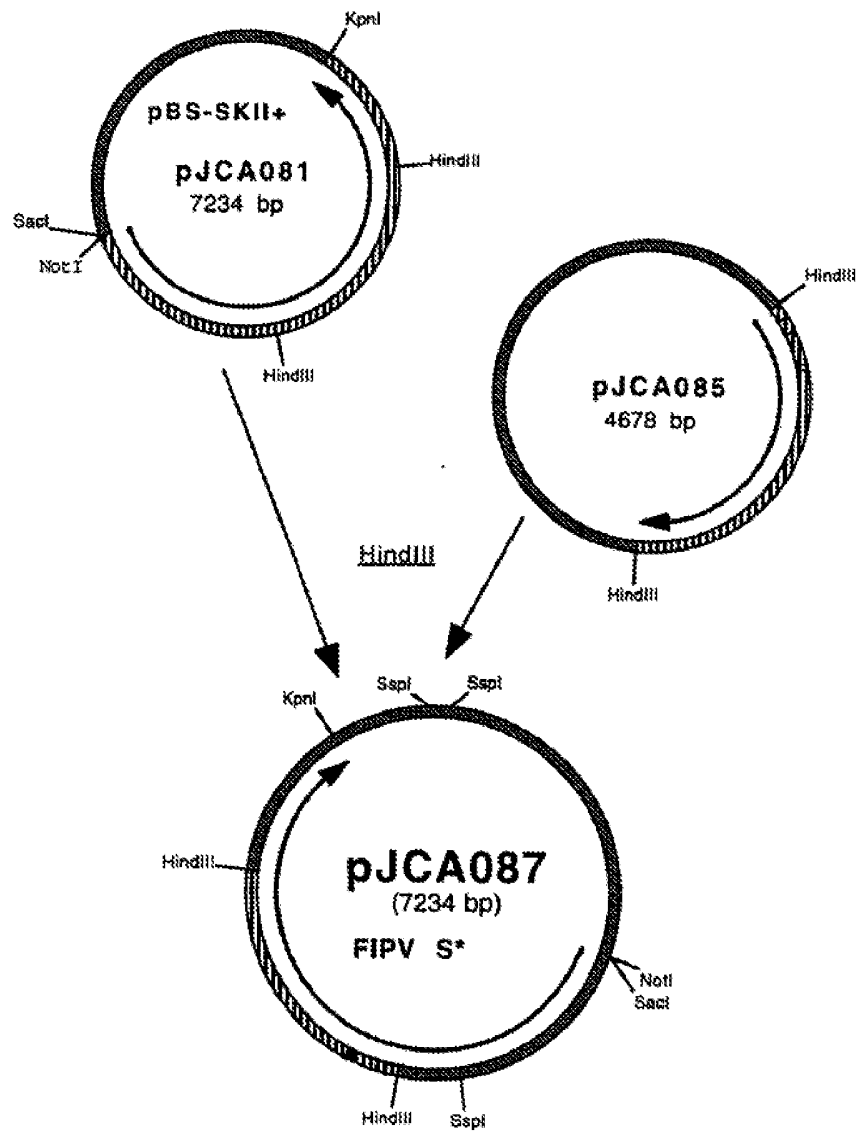


Figura 8

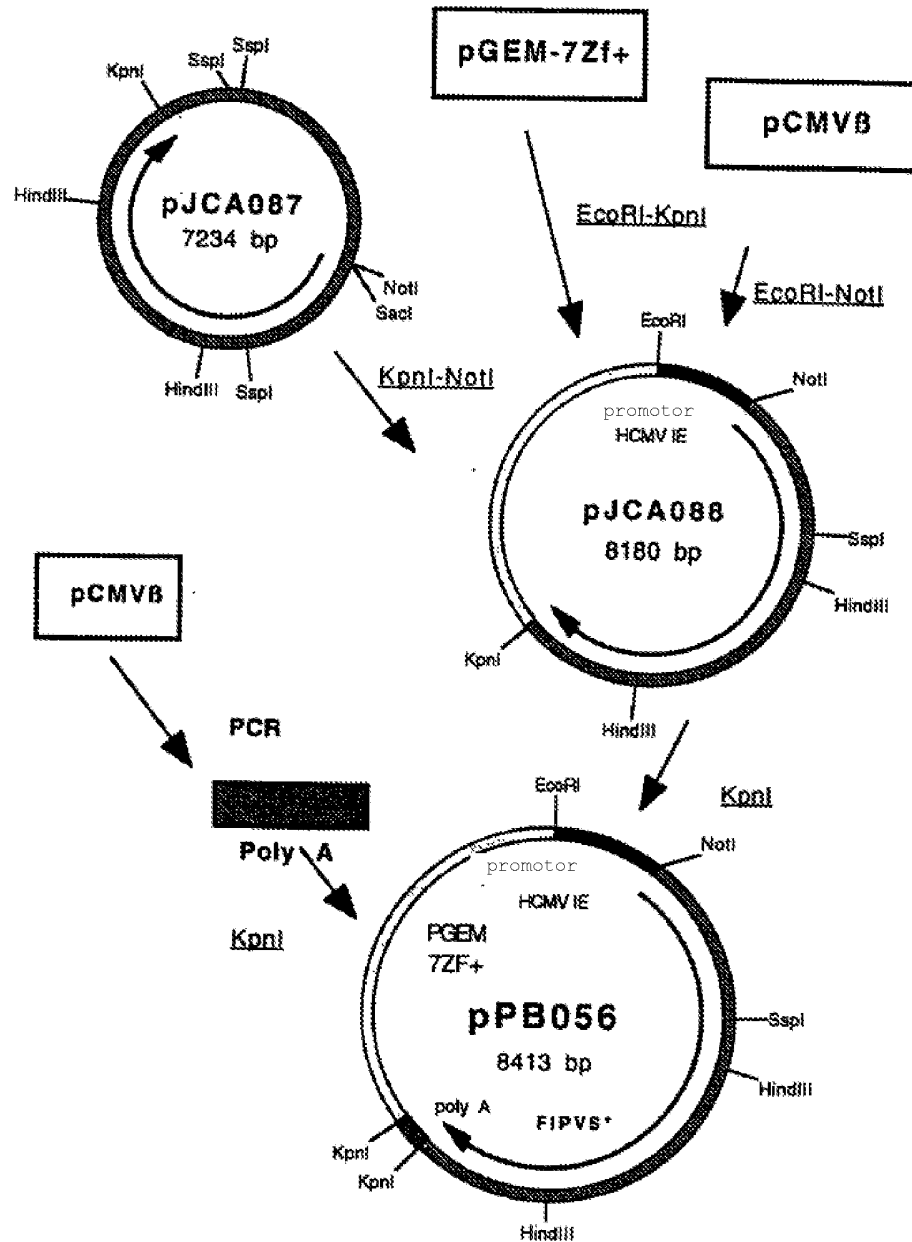


Figura 9

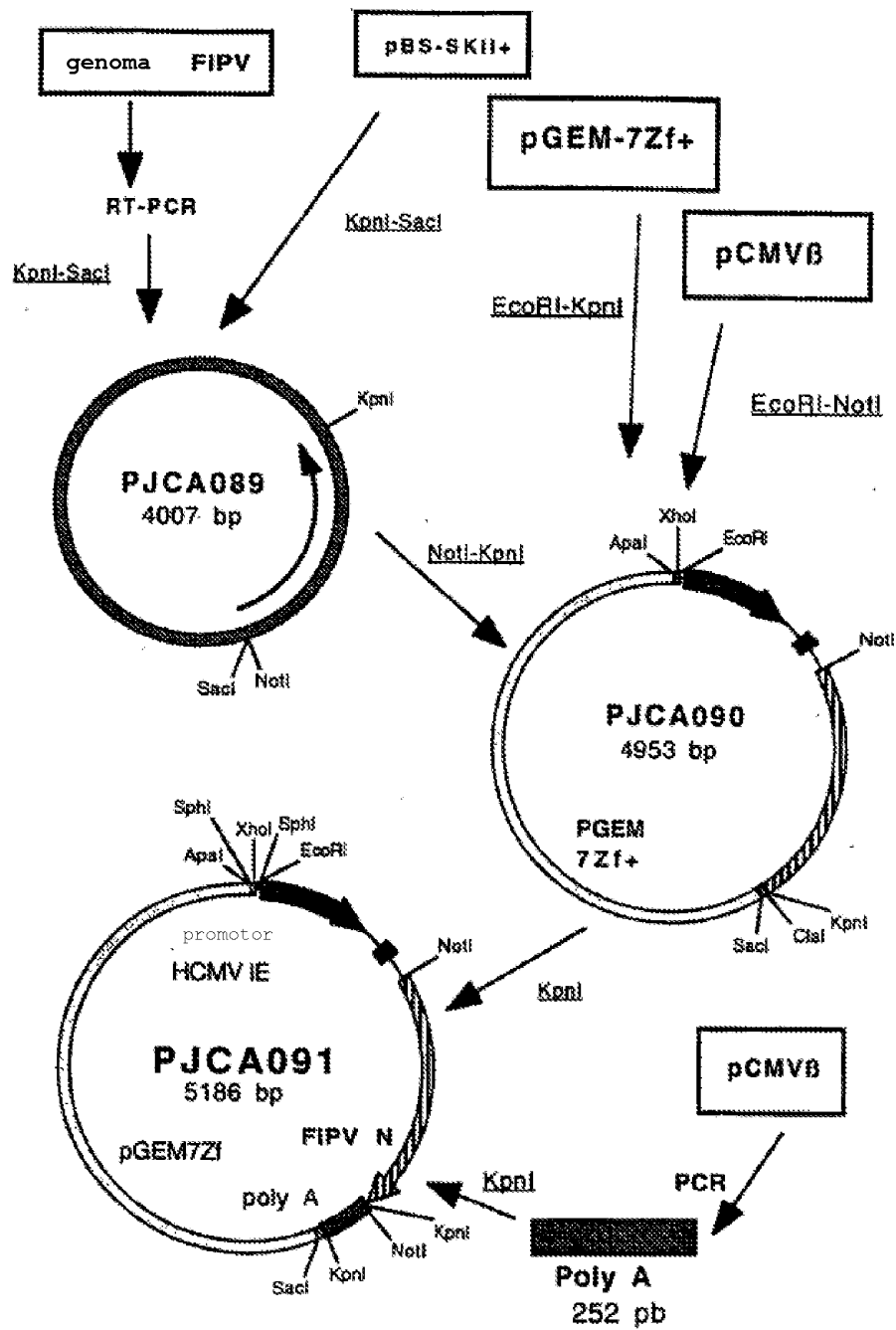


Figura 10

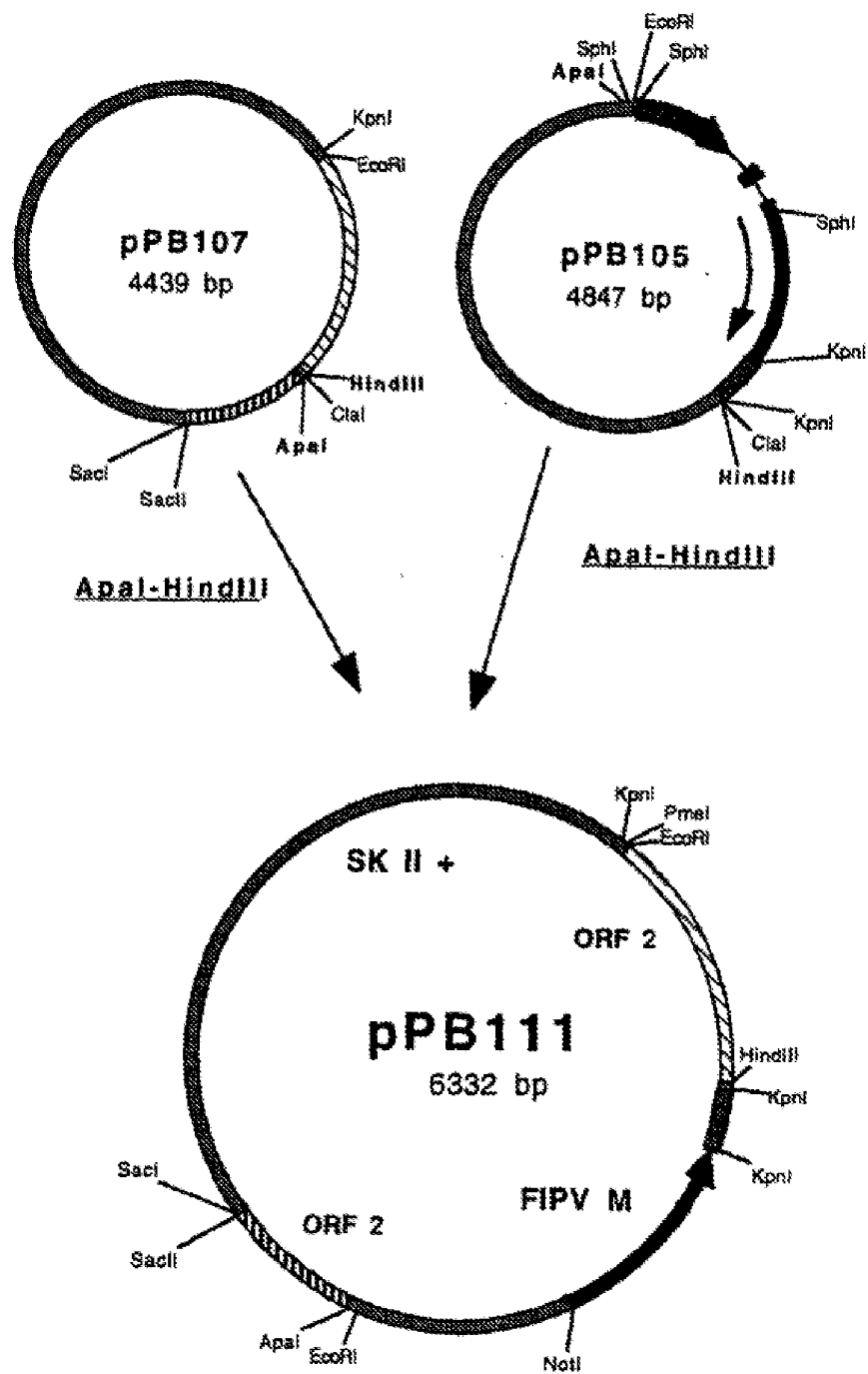


Figura 11

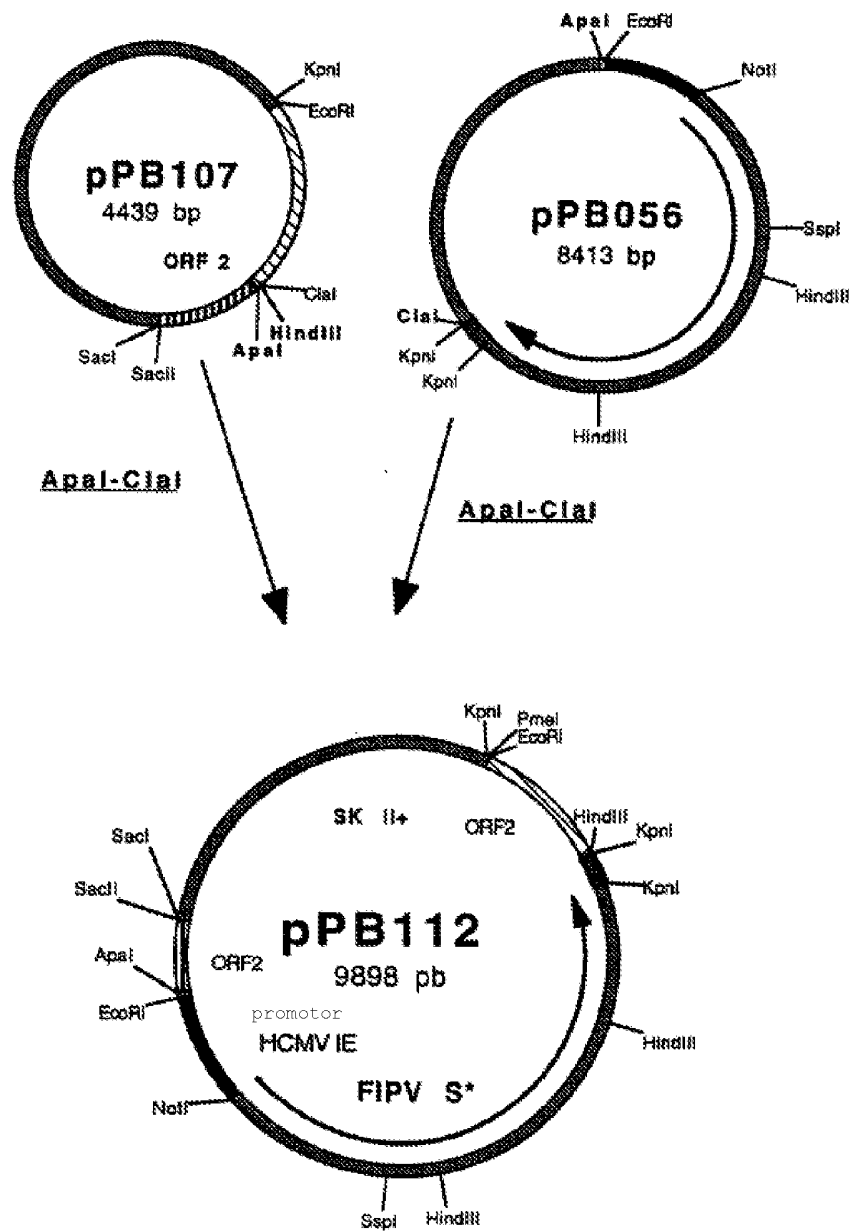


Figura 12

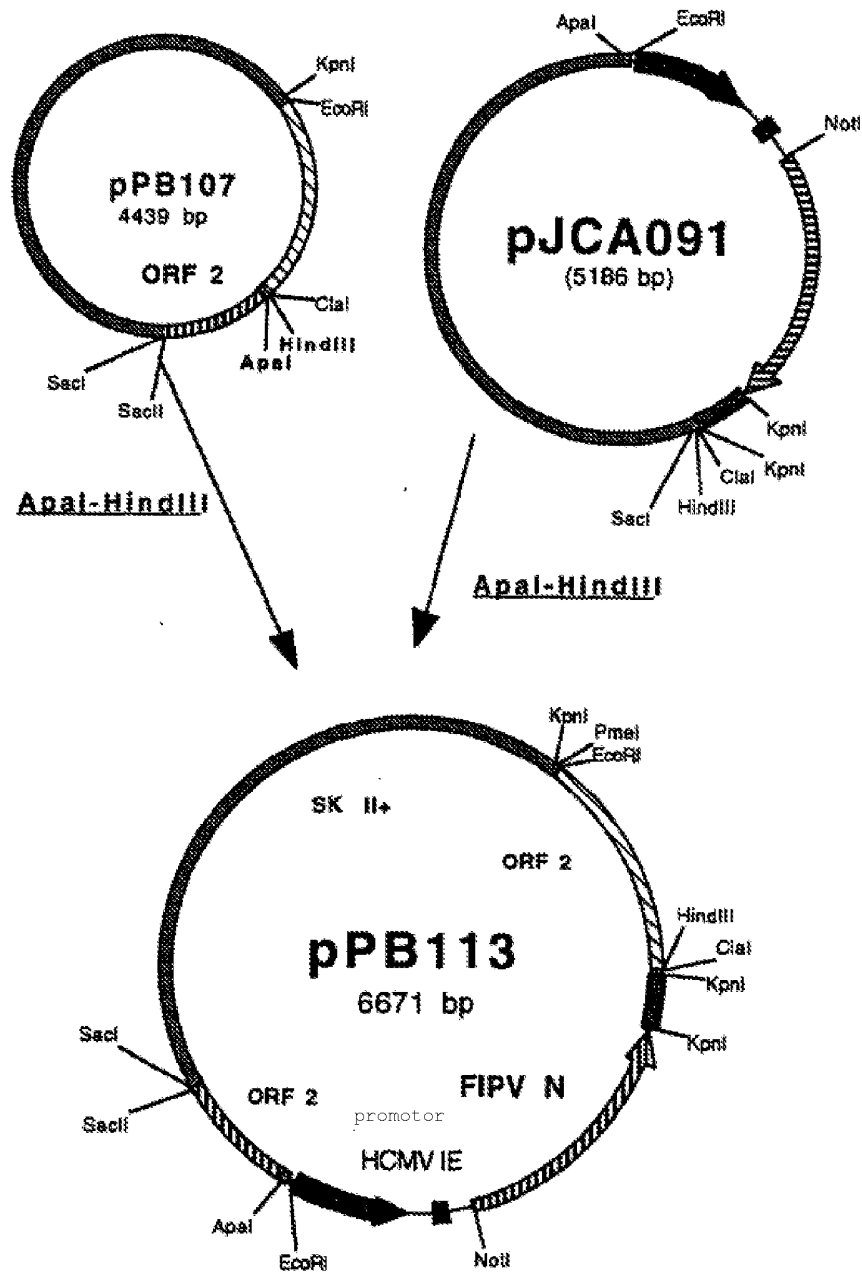


Figura 13

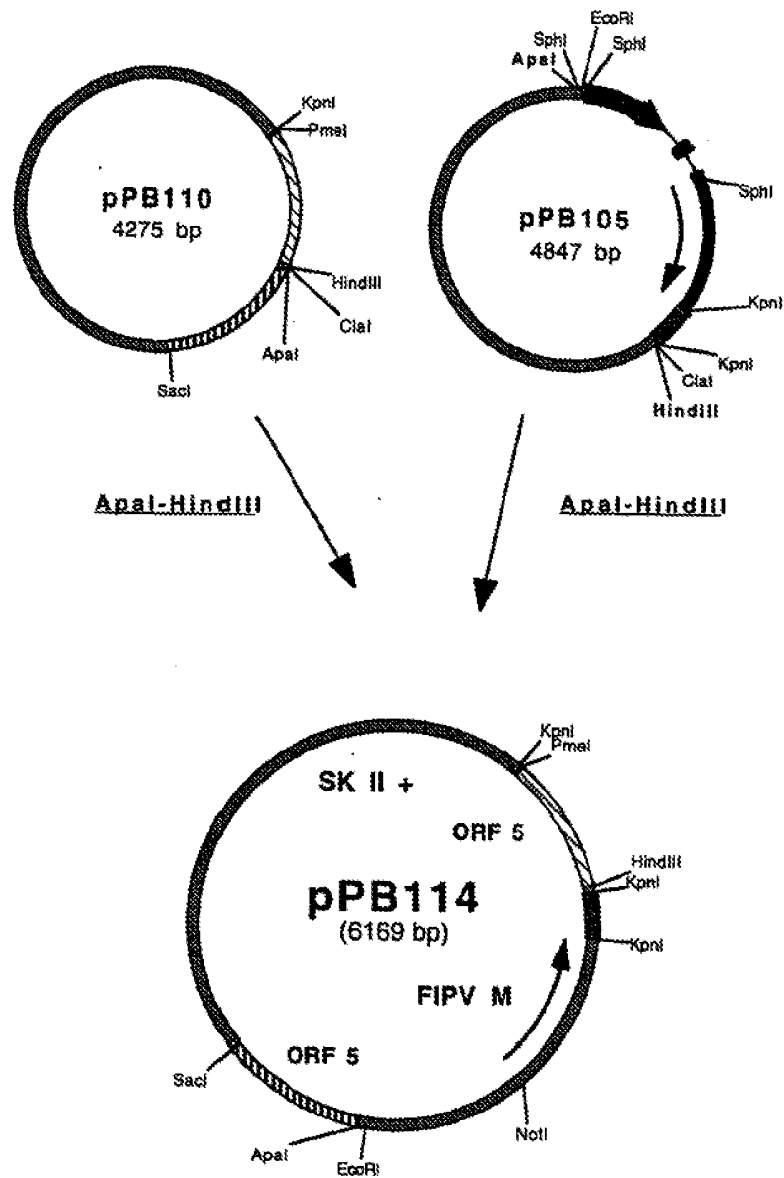


Figura 14

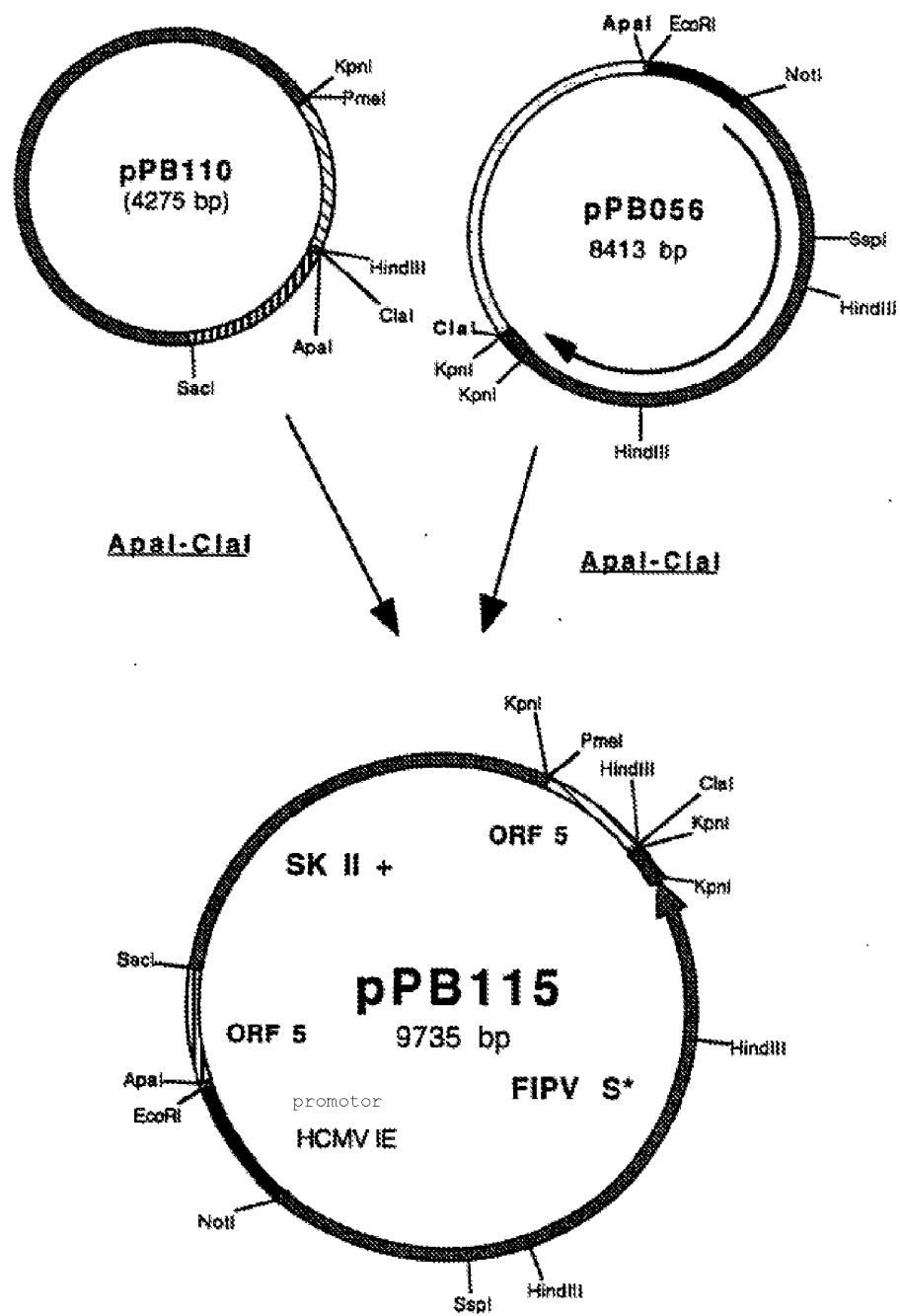


Figura 15

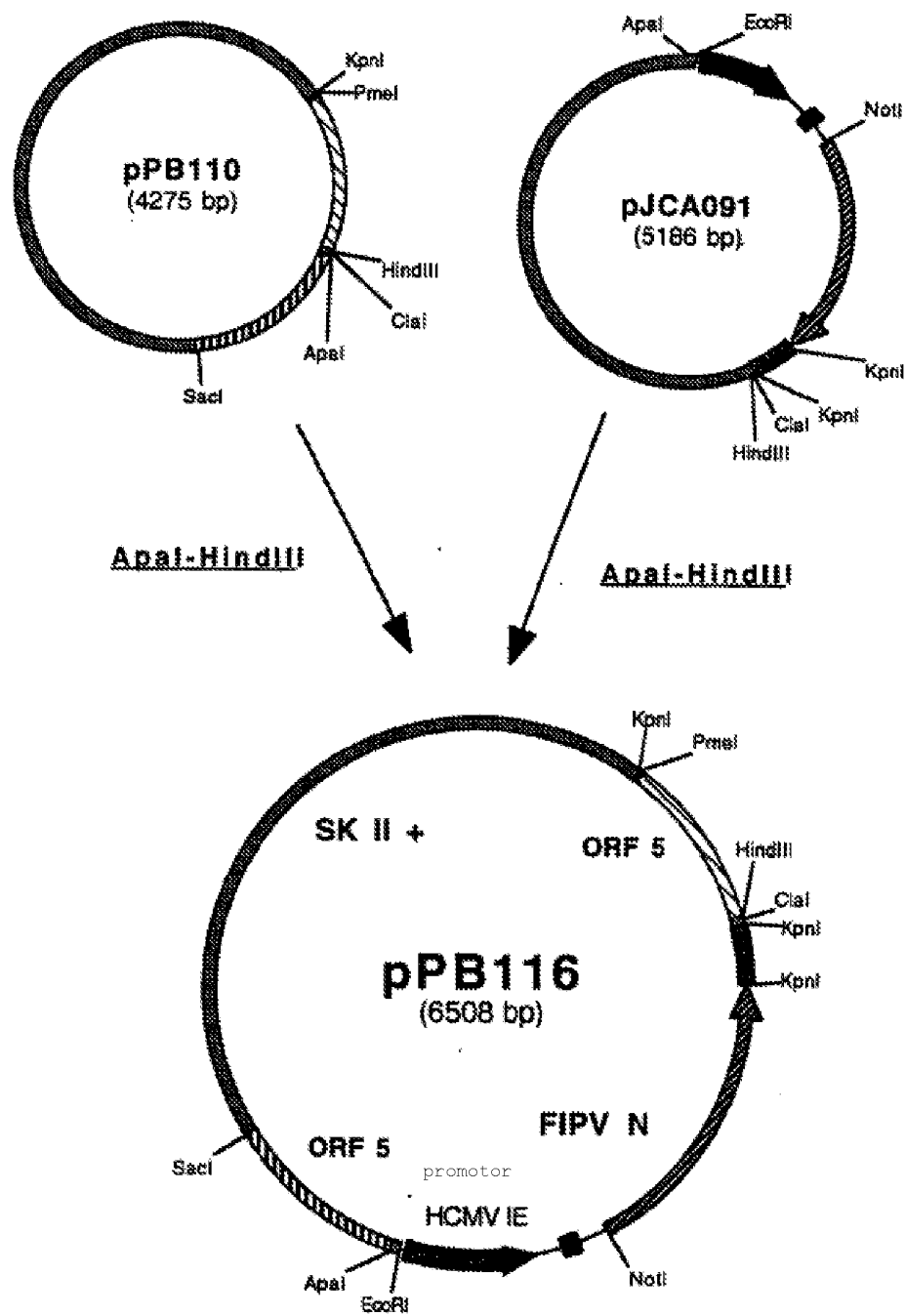


Figura 16

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- EP 0447303 A
- WO 9001547 A
- WO 9309238 A
- WO 9403621 A
- WO 9500172 A
- EP 0576092 A
- FR 9410379
- FR 2724385

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- R.C. WARDLEY et al. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, 1811-1819
- G.E. COLE et al. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, 4930-4938
- M.J. WILLEMSE et al. *J. Gen. Virol.*, 1994, vol. 75, 3107-3116
- G. BRADLEY et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 2534-2542
- OSTERHAUS A. et al. *J. Immunol.*, 1985, vol. 135, 591-596
- LUTZ H. *Vet. Microbiol.*, 1990, vol. 23, 131-146
- CLARK N. et al. *JAVMA*, 1991, vol. 199, 1433-1443
- THOMSEN D. et al. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, 1819-1824
- JARRETTO. et al. *AIDS*, 1990, vol. 4(1), S163-S165
- MIYAZAWA T. et al. *Arch. Virol.*, 1994, vol. 134, 221-234
- DE RHONDE A. et al. *Virology*, 1994, vol. 198, 257-264
- CARLSON J. et al. *J. Virol.*, 1985, vol. 55, 574-582
- MARTYN J. et al. *J. Gen. Virol.*, 1990, vol. 71, 2747-2753
- NEILL J. et al. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, 5440-5447
- CARTER M. et al. *Virology*, 1992, vol. 190, 443-448
- SAMBROOK J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- CHOMCZYNSKI P. ; SACCHI N. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 162, 156-159
- VENNEMAH. et al. *Virology*, 1991, vol. 181, 327-335
- DE GROOT R. et al. *J. Gen. Virol.*, 1987, vol. 68, 2639-2646